جامعـــة تشرين
كليـــة الزراعـــة
قسم وقاية النبات



تقصي وتوصيف فيروس تقزم القمح في سورية وبعض الدول المجاورة

رسالة قدِّمت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية
(قسم وقاية النبات)

إعداد
أحمد محمد ديب اقزيز

١٤٣٢هـ
٢٠١١ م



جامعة تشرين

كلية الزراعة

قسم وقاية النبات

تقصي وتوصيف فيروس تقزم القمح في سورية وبعض الدول المجاورة

رسالة قدمت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية (اختصاص وقاية نبات)

إعداد المهندس الزراعي

أحمد محمد ديب اقزيز

بإشراف

الدكتور عماد اسماعيل

أستاذ أمراض النبات الفيروسية

كلية الزراعة– جامعة تشرين

اللاذقية – سورية

الدكتورة صفاء قمري

أخصائية الأمراض الفيروسية

المركز الدولي للبحوث الزراعية في

المناطق الجافة (إيكاردا)، حلب – سورية

١٤٣٢هـ

٢٠١١ م

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في وقاية النبات،
من كلية الزراعة بجامعة تشرين.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for the degree of "Master of Science" in Plant Protection at the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University.

تصريح

أصرح بأن هذا البحث " **تقصي وتوصيف فيروس تقزم القمح في سورية وبعض الدول المجاورة**" لم يسبق أن قبل للحصول على شهادة وهو غير مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح

التاريخ

………………………

أحمد محمد ديب اقزيز

27 /6/٢٠١١

DECLARATION

This work "**Distribution and characterization of Wheat dwarf virus in Syria and some neighboring countries**" has not being submitted concurrently for any other degree.

Candidate

…………………………

Ahmed Ekzayez

Date: 27 / 6 /2011

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة " **تقصي وتوصيف فيروس تقزم القمح في سورية وبعض الدول المجاورة** " هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح السيد أحمد اقزيز بإشراف الدكتور عماد اسماعيل، أستاذ أمراض النبات الفيروسية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، سورية، والدكتورة صفاء محمد غسان قمري، أخصائية أمراض النبات الفيروسية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) حلب ـــ سورية . وأنّ أي مرجع ورد في هذه الرسالة موثق في النص.

المرشح	**بإشراف**	
....	....	....
أحمد اقزيز	أ.د. عماد اسماعيل	د. صفاء محمد غسان قمري

التاريخ: 27 /6/٢٠١١

CERTIFICATION

It is hereby certified that the work described in this thesis "**Distribution and characterization of Wheat dwarf virus in Syria and some neighboring countries**" is the results of Mr. Ahmed Ekzayez own investigations under the supervision of Dr Imad ismail, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Syria, and Dr. Safaa M. Ghassan Kumari, Virology Laboratory, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (**ICARDA**), Aleppo, Syria, and any reference to other researchers work have been duly acknowledged in the text.

Supervisors		**Candidate**
....	....	....
Dr. Imad Ismail	Dr. Safaa M.G. Kumari	Ahmed Ekzayez

Date: 27 / 6 /2011

شكر وتقدير

في كل نهاية ذكرى، وفي كل ذكرى درب طويل من التأمل والحنين، تختلط فيه مشاعر فرح الإنجاز مع عواطف صادقةٍ لكل صاحب بصمة على خطوات الدرب، لأستنطق اللسان بما خفي في خلجات الذات، مستحضراً من الأحاسيس أنقاها ومن الكلمات أصدقها، لأخط كل الشكر والتقدير لكل من رسم بمحبته جزءاً من لوحة اكتملت في هذا العمل، وابدأ بالصرح العلمي الذي قبلني طالباً على مقاعده {**جامعة تشرين**} عبر مقام رئاستها **الأستاذ الدكتور محمد يحيى معلا**، وكذلك **الأستاذ الدكتور سمير جراد** عميد كلية الزراعة، **والأستاذ الدكتور علي رمضان** رئيس قسم وقاية النبات لدعمهم ومساعدتهم بكل ما يحتاجه البحث العلمي.

وأتقدم بخالص الإمتنان والتقدير للمركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا) الذي تبنى هذا البحث وقدم له كل مايحتاج من دعم حتى آخر لحظة.

كل العرفان بالجميل لأساتذتي المشرفين على هذه الرسالة: **الأستاذ الكتور عماد اسماعيل** و**الدكتورة صفاء قمري**، لجهدهم المبذول في توجيه البحث وتصويب الأخطاء، ومراقبة كل خطوة من خطوات العمل باذلين في سبيل ذلك الوقت والجهد حتى وصل العمل إلى هذه المرحلة.

الشكر كل الشكر للجنة الحكم على الرسالة التي صوبت الأخطاء، وقومت الهفوات، **الأستاذ الدكتور أمين حاج قاسم، الأستاذ الدكتور عماد اسماعيل، والدكتور سليم الراعي.**

كما أخط عبارات الشكر والتقدير لزملاء الدرب الذين مدوا يد العون في مختلف مراحل البحث: **الدكتور محمد خلف، الدكتور سامر لبابيدي، الأستاذ علي صبيح**، أسرة مختبر الفيروسات **(نوران عطار، خليل المحمد، نهيدة الجاسم، منار وانلي)**، طلاب الدراسات في مختبر الفيروسات **(مصعب حلواني، نادر أسعد، ياسين النعسان، إلياس الإسحاق، محمد فرزات، محمد جرود، أية قنواتي)**

وأزجي عميق شكري للزملاء في مديرية الزراعة بإدلب، وفي مقدمتهم **الأستاذ نجيب طباع** مدير الزراعة والإصلاح الزراعي بإدلب.

وإلى من كانت عندهم المنطلق والختام، وكانوا قربي في كل لحظة، ومسحوا بأيدي محبتهم عرق الجهد والتعب، كما رافقني دعائهم في كل مرحلة حتى وصلت لمل أنا عليه: **أمي الحبيبة، زوجتي وولدي محمد**، أخوتي **(حسام، أماني، إياد، عبدالكريم)** أزجي لهم كل الإحترام والتقدير.

وختاماً أهدي هذه الرسالة لمن شجعني على خوض غمار العلم، ومن كان له دائماًالفضل في توجيهي ونصحي ودعمي بكل ماستطاع من بذل وعطاء.....قدوتي في كل أمر: **أبي الغالي.**

Tishreen University
Faculty of Agriculture
Department of Plant Protection



A survey and characterization of *Wheat dwarf virus* in Syria and some of its neighboring country

A thesis submitted in partial fulfillment of requirements for the degree of
M.Sc in Agriculture Engineering
(Plant Protection)

By

Ahmed Mohamad Dib Ekzayez

Supervision by

Dr. Imad Ismail
Faculty of Agriculture
Aleppo University
Aleppo- Syria

Dr. Safaa Kumari
Virology Laboratory, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria

2011

Tishreen University
Faculty of Agriculture
Department of Plant Protection



A survey and characterization of *Wheat dwarf virus* in Syria and some of its neighboring country

A thesis submitted in partial fulfillment of requirements for the degree of M.Sc. in Agriculture Engineering
(Plant Protection)

By
Ahmed Mohamad Dib Ekzayez

2011

فهرس المحتويات

المحتويات **رقم الصفحة**

فهرس الجداول

فهرس الأشكال

فهرس الملاحق

الملخص

يعد فيروس تقزم القمح *Wheat dwarf virus* (WDV)، جنس *Mastrevirus*، عائلة *Geminiviridae*) من أهم الفيروسات التي تصيب محاصيل الحبوب النجيلية [القمح (.*Triticum aestivum* L) والشعير (.*Hordum vulgare* L)] وبخاصة في أوربا. يسبب الفيروس أعراضاً تتمثل بالتقزم الشديد، الاصفرار، فشل عملية التسبيل (تكوين الرؤوس) وبالتالي تراجع في نسبة العقد ووزن البذور مما يؤدي إلى خسائر كبيرة في إنتاجية المحاصيل النجيلية.

أجري مسح حقلي خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩ لتقصي وجود فيروس تقزم القمح في سورية، تركيا ولبنان على محصولي القمح والشعير، حيث تم خلال عمليات المسح زيارة ١٦٨ حقلاً (٩٥ حقل قمح و٧٣ حقل شعير) موزعة على أهم مناطق زراعة القمح والشعير في الدول الثلاث، جمعت منها ٤٣٤٦ عينة انتقائية (٣٠٠١ عينة قمح و ١٣٤٥ عينة شعير) تحمل أعراض توحي بإصابة فيروسية (تقزم، اصفرار، تخطط، احمرار، موزاييك). كما أجري مسح حقلي آخر خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠١٠ شمل أهم مناطق زراعة القمح والشعير في سورية بهدف تأكيد وجود فيروس تقزم القمح في سورية على محصول القمح والشعير وفقاً للمعطيات المناخية المتغيرة بين مناطق الدراسة خلال الموسمين الزراعيين المدروسين، جمع خلاله ١٦٥٤ عينة (١٢٩١ عينة قمح، ٢٨٧ عينة شعير، ٤٦ عينة شوفان و ٣٠ عينة تريتيكال) من ٩٦ حقلاً (٧٠ حقل قمح، ٢١ حقل شعير، ٣ حقول شوفان وحقلين تريتيكال).

أظهرت نتائج الاختبارات المصلية/السيرولوجية باختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA) واستخدام مصل مضاد متخصص بالكشف عن فيروس تقزم القمح للعينات المجموعة بصورة انتقائية، وجود فيروس تقزم القمح في عدد من مناطق الدراسة في كلاً من سورية وتركيا، فيما لم تسجل أية إصابة في لبنان. كما تم التأكد من وجود فيروس تقزم القمح باستخدام إختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) وباستخدام بادئات متخصصة، عن طريق إعادة اختبار عدد من العينات التي أعطت نتائج إيجابية بإختبار بصمة النسيج النباتي المناعي.

خلال عمليات المسح في سورية، تم جمع عدد من نطاطات الأوراق المتواجدة في مناطق جمع العينات، وتم الاعتماد على الشكل المورفولوجي في تمييزها إلى أربع مجموعات مختلفة، درست كفاءة كل منها في نقل عزلتين سوريتين من فيروس تقزم القمح الأولى معزولة من نبات شعير (-SB 1248

09) والثانية معزولة من نبات قمح (SW 2131-09) في محافظة الحسكة. وبالتعاون مع قسم الحشرات المتحف البريطاني (التاريخ الطبيعي)، تم تصنيف نوع نطاطات الأوراق الذي استطاع نقل العزلة السورية SB 1248-09 بكفاءة ٩٥% على نباتات الشعير فقط، والذي تبين أنه النوع *Psammotettix provincialis* Ribaut، في حين لم تستطيع الأنواع الثلاثة الأخرى من نطاطات الأوراق من نقل كلتا العزلتين.

بينت دراسة التتابعات النكليوتيدية لقطعة من المجين تتضمن منطقة القراءة المفتوحة الثانية ORF2 والتي تشفر بروتين التضاعف الفيروسي (RepA) أن العزلة السورية SB 1248-09 من فيروس تقزم القمح، مشابهة للعزلة الإيرانية (رقم البنك الوراثي للجينات FJ620684.1) بنسبة تشابه ٩٩%، كما تشابهت مع بعض العزلات الأوربية بنسبة ٩٢% نذكر منها على سبيل المثال العزلة الهنغارية (رقم البنك الوراثي للجينات FM999832.1) والعزلة الألمانية (رقم البنك الوراثي للجينات AM942044.1)، مع العلم بأن جميع العزلات السابقة معزولة من نباتات شعير. في حين وجد أن العزلة السورية SW 2131-09 من فيروس تقزم القمح، تبين أنها مشابهة بنسبة تراوحت بين ٩٩-١٠٠% مع معظم العزلات الأوربية المعزولة من نبات قمح للفيروس WDV ونذكر منها العزلة الألمانية (رقم البنك الوراثي للجينات AM296023.1) والعزلة التشيكية (رقم البنك الوراثي للجينات FJ546191.1)، بإضافة إلى العزلة الصينية (رقم البنك الوراثي للجينات EF536868.1).

أظهرت شجرة القرابة الوراثية للعزلات المدروسة وجود مجموعتين منفصلتين، ضمت المجموعة الأولى عزلات الفيروس العالمية المعزولة من نباتات قمح، بما فيها العزلة السورية SW 2131-09 المعزولة من نبات قمح، في حين ضمت المجموعة الثانية العزلات الفيروسية العالمية المعزولة من نباتات شعير بما فيها العزلة السورية SB 1248-09 المعزولة من نبات شعير.

عند دراسة المدى العوائلي للعزلة السورية SB 1248-09 باستخدام الناقل *P. provincialis* على عدد من الأنواع النباتية التابعة للعائلة النجيلية. أظهرت النتائج أن نسبة إصابة نباتات الشعير وصلت إلى ٩٥% و ٩٠% في نباتات الشوفان (*Avena sativa* L.) بينما لم يتم إصابة الأنواع النباتية الآتية المستخدمة بالتجربة: القمح الطري (*Triticum aestivum* L.)، البوشرنته (*Bromus rigidus* Roth.)، قدم الديك (*Dactylis glomerata* L.)، الشربير (*Festura elatior* L.) والقمح القاسي (*Triticum turgidum* L.).

عند عزل وتنقية العزلة SB 1248-09 من فيروس تقزم القمح، تم الحصول على كمية تعادل ٢.٢- ٢.١٨ ميكروغرام من الفيروس النقي من كل كيلوغرام واحد من النسيج المصاب. وعند حقن الفيروس النقي في أرنب نيوزيلاندي، أمكن إنتاج مصل مضاد متعدد الكلون ذو نوعية جيدة، حيث أمكن باستخدام هذا المصل الكشف عن الفيروس المدروس بواسطة اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA) بحساسية عالية ووضوح عند استخدام المصل بتخفيف ١:١٠٠٠ واستمر المصل في الكشف عن الفيروس حتى التخفيف ١:٢٥٦٠٠٠.

المقدمة وأهداف البحث

تعد محاصيل الحبوب النجيلية (Cereals) وخاصة القمح (*Trtiicum aestivum* L.) والشعير (*Hordum vulgare* L.) من أهم مصادر الغذاء والبروتين وأرخصها لنسبة عالية من السكان في جميع أنحاء العالم، بالإضافة إلى أهميتها كأعلاف حيوانية.

تحتل زراعة المحاصيل النجيلية في سورية المرتبة الأولى من حيث الأهمية الاقتصادية والمساحة المزروعة، فقد بلغت المساحة المزروعة بها خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠٠٨ حوالي ٢,٧٧٤,١٤٠ هكتاراً غلت ٤,٧٣٦,١٥٩ طناً (منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة، ٢٠٠٩)، وتشكل هذه المساحة نسبة ٤٦% من إجمالي مساحة الأراضي القابلة للزراعة في سورية (المكتب المركزي للإحصاء، ٢٠١٠). كما تلعب هذه المحاصيل دوراً هاماً في اقتصاديات كلاً من تركيا ولبنان، حيث بلغت المساحة المزروعة بها في تركيا خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠٠٨ حوالي ١١,٩٥٥,٩٣٦ هكتاراً غلت ٣٣,٥٦٩,٦٢٧ طناً، أما في لبنان فقد بلغت المساحة المزروعة بالمحاصيل النجيلية خلال نفس الموسم ٦٧,٨٥٠ هكتاراً غلت ١٩١,٩٠٠ طناً (منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة، ٢٠٠٩).

تحتل سورية المرتبة السابعة والثلاثين على مستوى العالم من حيث إنتاج المحاصيل النجيلية، وقد أظهرت الإحصائيات أن معدل إنتاج محاصيل الحبوب في سورية، تركيا ولبنان متدن حيث بلغ ١٧٠٧.٢ كغ/هكتار، ٢٨٠٧.٧ كغ/هكتار و ٢٨٢٨.٢ كغ/هكتار، على التوالي، إذا ما قورن مع الدول المتقدمة ٦٦١٥.٢٩ كغ/هكتار (منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة، ٢٠٠٩). ويمكن أن يعزى هذا النقص في معدل الإنتاج لعدة أسباب من بينها الظروف الجوية والإصابة بالأمراض والآفات المختلفة، ومنها الأمراض الفيروسية التي تعد أحد الأسباب الكامنة وراء تدني الإنتاج، حيث أشارت الدراسات المرجعية السابقة إلى إصابة المحاصيل النجيلية بحوالي ٥٠ فيروساً في مختلف أنحاء العالم (Hull, 2002؛ Lapierre & Hariri, 2008)، أما في سورية فقد تم تسجيل الفيروسات الستة التالية: فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV)، جنس *Luteovirus*، عائلة *Luteoviridae*)، فيروس تقزم واصفرار الشعير-MAV *Barley yellow dwarf virus-MAV* (BYDV-MAV)، جنس *Luteovirus*، عائلة *Luteoviridae*)، فيروس اصفرار وتقزم الحبوب-RPV *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV)، جنس *Polerovirus*، عائلة *Luteoviridae*)، فيروس الموزاييك الشريطي للشعير

Barley stripe mosaic virus (BSMV، جنس *Hordeivirus*، العائلة لم تحدد بعد)، فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط *Barley yellow striate mosaic virus* (BYSMV، جنس *Cytorhabdovirus*، عائلة *Rhabdoviridae*)، فيروس الموزاييك المخطط للقمح *Wheat streak mosaic virus* (WSMV، جنس *Tritimovirus*، عائلة *Potyvridae*) (سكاف وآخرون، ١٩٨٨؛ Makkouk & Kumari, 1993, 1997؛ Makkouk *et al*., 1990, 2004)، أما في تركيا فقد تم تسجيل الفيروسات الستة السابقة بالإضافة لفيروس تقزم القمح *Wheat dwarf virus* (WDV، جنس *Mastrevirus*، عائلة *Geminiviridae*) (Köklü, 2004). في حين تم تسجيل أربع فيروسات تصيب محاصيل الحبوب في لبنان وهي: فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV (Makkouk *et al*., 1990)، فيروس الموزاييك الشريطي للشعير وفيروس الموزاييك المخطط للقمح (Nienhaus & Saad, 1967)، وفيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط (Makkouk *et al*., 2001).

ونظراً لحاجة الإنسان في كل أنحاء العالم إلى مزيد من الغذاء لتغطية احتياجات ملايين البشر الذين يظهرون إلى الوجود سنوياً، أصبح لازماً عليه عدم التقيد في قراءة الواقع البيئي والمرضي للمنطقة التي يعيش بها، والكف عن مصادفة الأمراض أو انتظارها حتى تتحول إلى أوبئة، إنما أصبح من الواجب عليه الإطلاع المستمر على أهم الأمراض التي تصيب مختلف المحاصيل بغض النظر عن توزعها الجغرافي والعمل الدؤوب من أجل تقصي تواجد هذه الأمراض في منطقته خصوصاً في ظل الانحرافات الحادة في العوامل البيئية التي تمر بنا. فالعوامل البيئية للكثير من الأمراض منذ عشرات السنين في سورية كانت غير مؤهلة لانتشارها بينما نجد العديد منها الآن مسبباً لخسائر اقتصادية وتجارية كبيرة تقدر بملايين الليرات السورية مثل مرض صدأ الأوراق الذي يصيب محصول القمح، ومن المعروف أن الأمراض الفيروسية هي من أسهل الممرضات انتقالاً.

نظراً لتصنيف فيروس تقزم القمح كأحد الممرضات على محصولي القمح والشعير في تركيا (Köklü، ٢٠٠٤)، وجدنا أنه من المهم التحري عن وجوده في سورية، بالإضافة للتحري عنه في لبنان وتركيا (بحكم التقارب الجغرافي من سورية)، ومعرفة الخسارة الإقتصادية التي يشكلها على محصولي القمح والشعير في تلك الدول. مع العلم بأنه تم مشاهدة حشرات نطاطات أوراق مشابهة لحشرات نطاطات الأوراق الناقلة لهذا الفيروس في بعض حقول المحاصيل النجيلية في سورية، فضلاً عن ملاحظة الكثير من الأعراض الفيروسية على محاصيل الحبوب النجيلية في المسوحات الحقلية السابقة التي أجريت خلال السنوات العشر الماضية في سورية، بواسطة مختبر الفيروسات التابع لإيكاردا دون التوصل للمسبب المرضي.

وتتلخص أهداف البحث بما يلي:

١. تقصي انتشار فيروس تقزم القمح في سورية وبعض الدول المجاورة (تركيا ولبنان) عن طريق إجراء مسح حقلي لمحصولي القمح والشعير في المناطق الرئيسية لزراعتها في تلك الدول خلال الموسمين الزراعيين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و٢٠٠٩/٢٠١٠
٢. جمع حشرات نطاطات الأوراق من حقول محاصيل الحبوب النجيلية الممسوحة في سورية وتوصيفها ودراسة كفاءة نقلها لفيروس تقزم القمح.
٣. اختيار عزلة أو عزلتين سوريتين من فيروس تقزم القمح ودراستها بالتفصيل عن طريق :

- الإختبارات المصلية/السيرولوجية (اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي وباستخدام أمصال مضادة متخصصة).
- الاختبارات البيولوجية الجزيئية (اختبارات التفاعل المتسلسل للبوليميراز PCR وتحديد التسلسل النوكليوتيدي للحمض النووي) ومقارنة العزلات السورية مع العزلات العالمية.
- دراسة المدى العوائلي.
- طرائق النقل.
- إنتاج مصل مضاد لإحدى العزلات السورية المدروسة.

الفصل الأول

١. الدراسات المرجعية

١.١. واقع زراعة محاصيل الحبوب النجيلية في تركيا، سورية ولبنان

تشير الإحصاءات الزراعية للموسم ٢٠٠٨/٢٠٠٩ إلى أن تركيا تتفوق على سورية ولبنان في زراعة وانتاج محاصيل الحبوب (الشكل ١.١) (منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة، ٢٠٠٩)، يعود ذلك لاختلاف الظروف البيئية والمساحات المزروعة في كل من الدول المذكورة. حيث تقع تركيا ضمن المناخ المعتدل عموماً، ويلاحظ تباين مناخي واضح بين مناطقها، والسبب في ذلك هو التنوع في تضاريسها، فباستثناء المنطقة الشمالية الشرقية المطلة على البحر الأسود فإن صفات المناخ المتوسطي هي التي تميز المناخ في الجزء الأسيوي من تركيا، حيث تتميز منطقة البحر الأسود بديمومة هطول الأمطار على مدار العام بحيث لا نجد فيها شهراً يخلو من هطول الأمطار والتي تتراوح معدلاتها بين ٧٠٠-٨٠٠ مم، بينما تتراوح كمية الأمطار في المنطقة الجنوبية والغربية المشرفة على البحر المتوسط وبحر إيجة بين ٥٠٠-١٠٠٠ مم، وتهطل غالبية الأمطار في نصف السنة الشتوي، في حين يكون فصل الصيف دافئاً ويندر هطول الأمطار في شهري تموز وآب، فيما تقل كمية الأمطار السنوية الهاطلة في وسط تركيا (منطقة الأناضول) حيث تتراوح بين ٢٠٠-٥٠٠ مم، وتعتبر هذه المنطقة من أكثر مناطق تركيا زراعة للحبوب بما تتمتع به من مناخ شبه جاف ملائم لزراعة هذه المحاصيل. والجدير بالذكر بأن ٥٠% من الأراضي القابلة للزراعة والتي تبلغ ٣٩,١٢٢,٠٠٠ هكتاراً تستخدم لزراعة محاصيل الحبوب، ويحتل القمح المرتبة الأولى في إنتاج الحبوب ويأتي بعده الشعير والذرة الشامية (منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة، ٢٠٠٩).

كما تتمتع سورية ولبنان بمناخ متوسطي أيضاً وبهطول مطري يتركز بشكل رئيسي في فصل الشتاء، ويكون فصل الصيف حار وجاف. تبلغ المساحات التي تتلقى هطول مطري أكثر من ٣٠٠ مم سنوياً في سورية حوالي ٢٧.٩%، وتبلغ المساحة التي معدل أمطارها ما بين ١٠٠-٣٠٠ مم سنوياً حوالي ١٧%، بينما تبلغ مساحة الأراضي التي لا تصلح للزراعة المطرية/البعلية وتهطل عليها أمطار أقل من ١٠٠ مم سنوياً حوالي ٥٥.١% (الشكل ٢.١). كما أن ٤٦% من الأراضي القابلة للزراعة والتي تبلغ ٦,٠١٢ ألف هكتار تستخدم لزراعة محاصيل الحبوب في سورية. ويحتل القمح المرتبة الأولى في إنتاج الحبوب ويأتي بعده الشعير والذرة (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، ٢٠٠٩). أما في لبنان فقد شكلت الحبوب المصدر الغذائي الأهم للاستهلاك البشري وللغذاء الحيواني.

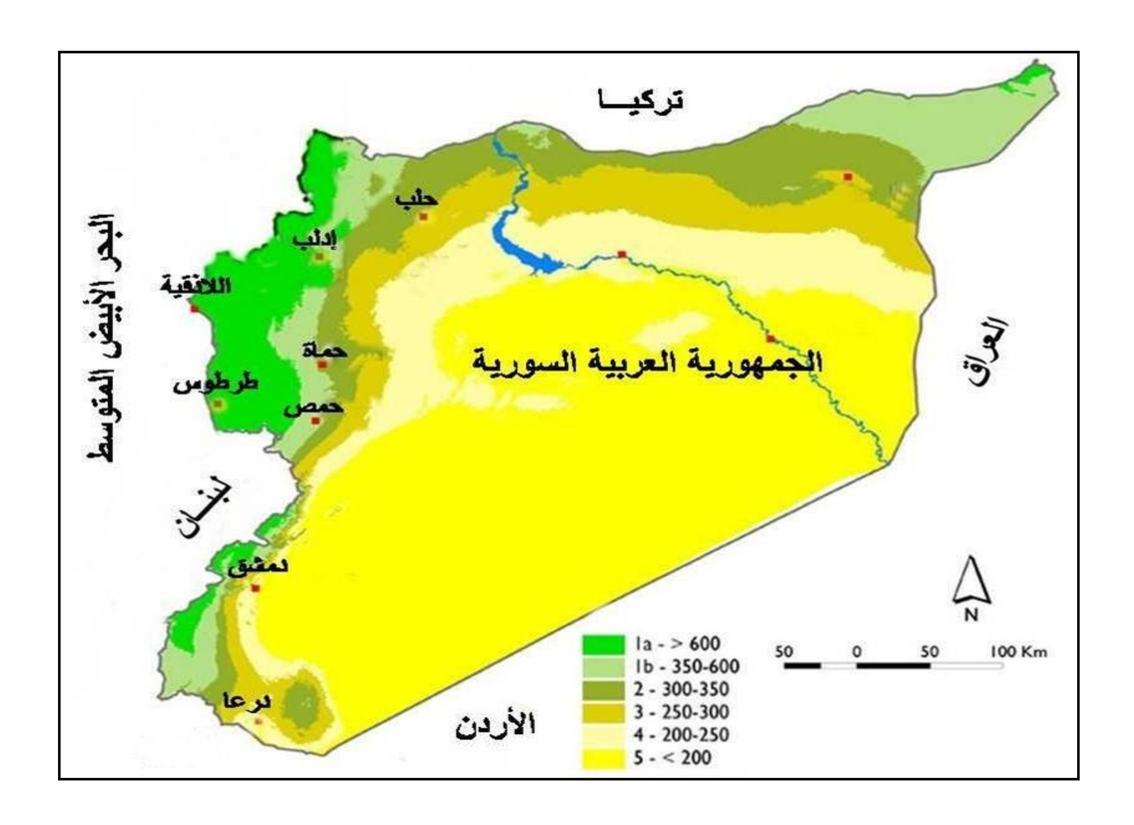
وهي تحتل مركزاً مهماً في بنية الإنتاج الزراعي اللبناني منذ القدم إذ عُرف سهل البقاع "باهراءات روما". وعرفت المساحة المزروعة بالحبوب في لبنان اتساعاً ملحوظاً خلال السنوات الأخيرة، فارتفعت من ٥٢,٠٠٠ هكتار عام ١٩٩٨ إلى ما يقارب ٥٦,٠٠٠ هكتار عام ٢٠٠٢، وهذا مرده إلى وفرة الأراضي الزراعيّة المرويّة بعد إزالة الدعم عن الشوندر السكري عام ٢٠٠١، إذ سجلت المساحات المزروعة بالقمح زيادة نسبتها ٨% بين عامي ٢٠٠١ و٢٠٠٢. وقد مثّل القمح ما نسبته ٨٠% من المساحة المزروعة بالحبوب عام ٢٠٠٢، غالبيته من نوع القمح القاسي. تمثل الحبوب المروية ربع المساحة الاجمالية المزروعة بالحبوب، وتبلغ هذه النسبة ثلث المساحة الاجمالية المزروعة بالحبوب في البقاع. تزرع الحبوب في لبنان بشكل أساسي في سهل البقاع (٥٧% من المساحة الإجماليّة للحبوب) يليه لبنان الشمالي (٢٣%)، فالنبطية (١٢%)، ثم الجنوب (٧%)، وتبقى الزراعة البعليّة سائدة في الشمال والنبطية والجنوب (الزراعة في لبنان، ٢٠٠٥).

تتشابه تقريباً مواعيد زراعة محاصيل الحبوب في كلاً من سورية، لبنان والأجزاء الجنوبية من تركيا، حيث يزرع القمح والشعير في سورية خلال الفترة الواقعة ما بين منتصف تشرين الثاني إلى منتصف كانون الأول (كيال، ١٩٨٨). بينما تتأخر مواعيد الزراعة في هضبة الأناضول والأجزاء الشمالية من تركيا وذلك لملائمة للظروف المناخية السائدة.

تزايدت الغلة الحبيبة لمحصول القمح في سورية منذ بداية التسعينات دون زيادة ملحوظة في وحدة المساحة (منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة، ٢٠٠٩)، وذلك بسبب امتلاك المزارع لأصناف محسنة (سلسلة أصناف القمح شام) ذات الإنتاجية المرتفعة ومقاومة الأمراض التي يزرعها في المناطق المروية، إضافة للأصناف المحلية (أصناف القمح حوراني، حماري، وبياضي، وأصناف الشعير الأبيض والأسود) التي يزرعها بعلاً (كيال، ١٩٨٨). تتركز زراعة الشعير في المناطق التي يقل معدل الهطول المطري السنوي عن ٣٠٠ مم (شحادة، ٢٠٠٣). تتراوح نسبة زراعة القمح القاسي والقمح الطري بحدود ٤٠% و ٦٠%، على التوالي. والاتجاه الحالي يهدف إلى تقليص مساحة القمح الطري والتوسع بزراعة القمح القاسي للاستفادة من الميزة النسبية للقمح القاسي السوري في سوق الحبوب العالمي لكونه يتمتع بخصائص نوعية جيدة من حيث المحتوى البروتيني واللون والبلورية (شحادة، ٢٠٠٣). أطلقت الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية السورية بالتعاون مع المركزين الدوليين إيكاردا وأكساد أصناف القمح الطري المحسنة (شام 4، شام 6، شام 8، بحوث 4، بحوث 6) وأصناف القمح القاسي المحسنة (شام 1، شام 3، شام 5، بحوث 7، جزيرة 7، أكساد 65) (شحادة، ٢٠٠٣) وأصناف الشعير المحسنة (سلسلة فرات) (كيال، ١٩٨٨).



شكل ١.١. مخطط بياني، يوضح إنتاجية محاصيل الحبوب في كلاً من سورية وتركيا ولبنان خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩ (FAO, 2009).



شكل ٢.١. خريطة سورية، توضح تقسيم المناطق تبعاً للموقع الجغرافي والتقسيم المناخي ومعدل الهطول المطري (المصدر: إيكاردا، ٢٠٠٦؛ بتصرف).

تشكل زراعة الحبوب، خاصةً القمح، أحد أهم محاور الزراعة اللبنانية بالنظر إلى الدور الأساسي الذي تلعبه على مستوى عادات المطبخ اللبناني، وبالنظر إلى دورها الأساسي في تغذية الحيوان، وإلى موقعها الخاص في الدورة الزراعية وعلى مستوى الأمن الغذائي. لذلك فقد هدف برنامج تطوير زراعة الحبوب إلى اعتماد برنامج يهدف إلى اختيار أصناف محلية خاصة في المناطق التي يزرع منتجوها الأصناف التقليدية، إذ يعتبر اعتماد البذور الملائمة أساسي لزيادة إنتاجية هذه الأصناف. كما تم القيام بأبحاث مختلفة مع عدة مراكز بحثية بغرض تطوير أصناف محسنة من الحبوب (القمح، الشعير والذرة). مما أدى لإرتفاع ملحوظ في إنتاجية الأنواع الرئيسية للحبوب من حوالي ٨٨ ألف طناً عام ١٩٩٧ إلى ما يقارب ١٤٠ ألف طن عام ٢٠٠٢، بسبب تحسن المردود الذي ارتفع من ٢.٧ طن/هكتار عام ٢٠٠٠ الى ٣.١ طن/هكتار عام ٢٠٠١. ويغطّي الاستيراد حوالي ٨٠% من حاجيات لبنان من القمح حيث قاربت الكميّات المستوردة ٤٨٠ ألف طن عام ٢٠٠٤ (الزراعة في لبنان، ٢٠٠٥).

٢.١. فيروس تقزم القمح *Wheat dwarf virus* (WDV، جنس *Mastrevirus*، عائلة *Geminiviridae*)

١.٢.١. الصفات العامة

وصف فيروس تقزم القمح (WDV) لأول مرة من قبل Vacke، عام ١٩٦١ في الأجزاء الغربية من جمهورية تشيكوسلوفاكيا، رغم أن مشاهدة أعراض المرض يعود تاريخها إلى عام ١٩٠٢، حيث سبب أضرراً على النجيليات في السويد، ودعي آنذاك Slidsjuka، كما عادت هذه الأعراض للظهور مسببة الأضرار ذاتها في كلاً من الأعوام ١٩١٢، ١٩١٥ و ١٩١٨ (Nilsson-Ehle, 1918). ظهور نفس الأعراض بشكل وبائي عام ١٩٤٢ كان موضوع بحث كبير حول ذلك المرض لكن دون معرفة المسبب (Lindsten, 1959)، حتى عام ١٩٦٠ حيث سبب الفيروس خسائر كبيرة على محصول القمح الشتوي في جمهورية تشيكوسلوفاكيا، وكان التعريف الأول للفيروس من قبل العالم Vacke، الذي لاحظ ترافق هذا المرض مع عدد غير طبيعي من نوع محدد من نطاطات الأوراق من النوع *Psammotettix alienus* Dahlbom، واستطاع أن يثبت بأن هذه الحشرة هي ليست الممرض كما كان سائداً إنما تلعب دور ناقل للممرض، والذي هو عبارة عن فيروس اسماه وفقاً للأعراض الملاحظة على النباتات المصابة (Wheat dwarf virus). تعاقبت بعدها العديد من الأبحاث التي تدرس خصائص وصفات هذا الفيروس بوصفه أحد الفيروسات الإقتصادية على بعض المحاصيل النجيلية، وبخاصة في جمهورية السويد، حيث قام العالم Lindsten وزملائه بالعديد من التجارب لتعزيز صحة قول Vacke والتأكيد على أن الأعراض المتواجدة على المحاصيل النجيلية والتي لم يعرف لها من مسبب

من قبل تعود إلى فيروس تقزم القمح، وليس للحشرات سوى دور الناقل لهذا الفيروس، كما استطاعوا مشاهدة جسيمات توأميه الشكل في العصارة النباتية المأخوذة من نباتات مصابة بواسطة المجهر الإلكتروني (Lindsten *et al*., 1980).

الحمض النووي للفيروس من النوع ssDNA، دائري الشكل وحيد السلسلة يتألف من حوالي ٢٧٠٠ نيكليوتيد، الوزن الجزيئي للغلاف البروتيني ٢٨.٤×١٠^٣ دالتون، الجسيمات الفيروسية توأمية الشكل غير مغلفة، قطرها ١٨ نانومتراً، وطولها ٣٠ نانومتراً، والحمض النووي يشكل ٢٠% من محتويات الجسيمات الفيروسية (Lindsten *et al*., 1980 ؛Lapierre *et al.,* 1991 ؛Agrios, 1997). يتضاعف المكنون الوراثي لهذا الفيروس ضمن نوى الخلايا المصابة، وتضاعفه لا يعتمد على وجود فيروس مساعد (Lindsten *et al*., 1980 ؛Lapierre *et al*., 1991).

تم تعريف سلالتين من فيروس تقزم القمح إحداها تصيب القمح كعائل نجيلي بينما تصيب الأخرى محصول الشعير (Schubert *et al*., 2007 ؛Lindsten & Vacke, 1991 ؛Köklü *et al*., 2007؛ Vacke *et al.,* 2004)، لوحظ وجود تداخل كبير في المدى العوائلي لكل من السلالتين حيث تصيب كلا منهما العديد من الأعشاب البرية ضمن العائلة النجيلية (Lindsten & Vacke, 1991؛ Vacke, 1972 ؛Mehner, 2005)، وعند دراسة تتالي القواعد الآزوتية لكلا السلالتين لوحظ وجود تطابق بنسبة ٨٣-٨٤% (Schubert *et al*., 2007 ؛Köklü *et al*., 2007)، لذلك اقترحت الدراسات الحديثة فصل كلاً من سلالتي الفيروس إلى نوعين مختلفين (Schuberet *et al*., 2007). رغم أن قرارات اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات (ICTV) تنص على أنه يتم الفصل بين سلالتين إلى نوعين مختلفين عندما يكون نسبة التشابه في تتابع القواعد الآزوتية أقل من ٧٥%، لكن تبعاً لصفات وخصائص العائلة *Geminiviridae* يمكن اعتبار نسبة التشابه المطلوبة لفصل سلالتين إلى نوعين مختلفين تصل حتى ٨٩% (Fauquet, 2003 ؛Martin *et al.,* 2001)، والاسم المقترح للسلالة التي تصيب الشعير هو Barley dwarf virus (Schubert *et al*., 2007)، ولكن حتى الآن لم يصدر أي قرار حول ذلك من اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات.

١.٢.٢. الأعراض والمدى العوائلي

تعتبر تسمية الفيروس من قبل Vacke (١٩٦١) دلالة على العرض الأكثر تميزاً لهذا الفيروس وهو التقزم الشديد الملاحظ على النجيليات بشكل عام، كما يترافق ذلك مع اصفرار في الأوراق ناتج عن تواجد جسيمات الفيروس ضمن أوعية اللحاء مما يؤدي إلى تراكم الكربوهيدرات وقلة تكون أو تفكك

الكلوروفيل في الأوراق. يعد Tullgren (١٩١٨) أول من وصف الأعراض على النباتات المصابة قبل معرفة المسبب، حيث لاحظ زيادة في عدد الإشطاءات، تقزم شديد، تشوه السنابل المتشكلة، ونقص في الغلة منشأه خلل في عملية التسبيل (تكوين الرؤوس)، ناتج عن انتفاخ الغمد الذي يحيط بالسنبلة وانفراط حبات قمح داخله، وبالتالي سقوط هذه الحبات على الأرض مع أدنى حركة ميكانيكية تصيب السنبلة، كما أكد Lindsten وآخرون (١٩٨٠) مشاهدتهم لنفس الأعراض على نباتات القمح الشتوي المصابة لكنهم كانوا أول من أشار إلى التشوهات التي لحقت بالحبوب المتشكلة من جراء الإصابة. تتميز الأعراض كونها جهازية، وتكون الإصابة بالحقل على شكل قطاعات منتشرة على كامل مساحة الحقل (Lindsten & Vacke, 1991؛ Vacke, 1972).

يصيب الفيروس عدداً كبيراً من الأنواع التابعة للعائلة *Graminea* منها: القمح (*Triticum* spp.)، الشيلم (*Secale ceveale* L.)، الشوفان (*Avena sativa* L.)، الشعير (*Hordeum vulgare* L.)، إضافة إلى بعض الأنواع البرية التي تعتبر كعائل بديل نذكر منها: البوشرنته (*Bromus seclinus* L.)، ذيل الارنب البيضي السنبلة (*Lagurus ovatus* L.)، والنجيل البلدي (*Lolium multiflorum* L.)، *L. temulen* L. و *L. remotum* L.، القبأ الحولي (*Poa annua* L.)، وهناك بعض الأنواع التابعة للعائلة النجيلية غير حساسة للإصابة بهذا الفيروس نذكر على سبيل المثال: قدم الديك (*Dactylis glomerata* L.)، الشربير (*Festuca pratensis* L.) و الذرة الصفراء (*Zea mays* L.) (Lindsten, 1970؛ Lindsten & Vacke, 1991؛ Vacke, 1972؛ Vacke & Cibulka, 1999). أمكن استخدام كلاً من الشعير، الشوفان، الذرة، والقمح كنباتات دالة تصاحبها أعراض مميزة للإصابة بهذا الفيرس حيث تكون الأعراض الملاحظة على الشعير تقزم النباتات وتشوه الرؤوس المتشكلة، بينما يلاحظ على القمح اصفرار وتقزم شديد وعدم تشكل رؤوس في النبات المصابة، أما الذرة فتعد من الأنواع المقاومة للإصابة، لذلك لا يلاحظ عليها أية أعراض (Lindsten & Vacke, 1991؛ Vacke, 1972). غالباً يستخدم الشعير والقمح للحفاظ على الفيروس وإكثاره في البيوت الزجاجية (Lindsten *et al*, 1980). أجريت دراسة في السويد عام ١٩٩٨ أثبتت إصابة المروج الخضراء المحيطة بحقول القمح المصابة بالفيروس، حيث تم جمع أعداد من النطاطات حاملة للفيروس، إضافة لملاحظة التقزم والإصفرار على هذه المروج (Arenö, 1999). كما أثبتت التجارب على أن الزراعة المبكرة تتعرض لخطر الإصابة بشكل أكبر من الزراعة المتأخرة، حيث أن الإصابة بمرحلة البادرة تؤدي إلى تقزم شديد وموت النبات قبل الوصول إلى مرحلة التسبيل (تكوين الرؤوس)، بينما الإصابة في مراحل متأخرة تقتصر على تشوهات في السنابل والحبوب المتكونة (Felix *et al.*, 1992؛ Lindsten & Lindsten, 1999؛ Praslicka, 1996).

عرّفت عدة عزلات من فيروس تقزم القمح تختلف فيما بينها بالمدى العوائلي، على سبيل المثال العزلة WDVs التي عرفت في السويد، وجد أنها تصيب القمح الشتوي والشيلم ولم يثبت إصابتها للشعير، بينما عرفت العزلة WDVc في تشيكوسلوفاكيا وفرنسا ووجد أنها تصيب كلاً من القمح والشعير على حد سواء (Vacke, 1972؛ Bendahmane *et al*., 1995).

يحدث الانتشار الأولي للفيروس في حقول القمح الشتوي في الخريف عندما تهاجر بالغات النطاطات إلى الحقول المزروعة حديثاً وتصيب البادرات، وتتراوح نسبة الإصابة الأولية بين ٥–٧٥%. بينما يكون الانتشار الثانوي في الربيع عندما تفقس حوريات النطاطات وتكتسب الفيروس من النباتات المصابة (Fohrer *et al*., 1992). أكد Vacke (١٩٧٢) بأن النبات يكون أكثر حساسية حتى مرحلة الورقة الواحدة بينما تتراجع الحساسية في المراحل المتقدمة، وأكدت الدراسات أيضاً أن مقاومة النبات للمرض تزداد عند مرحلة ظهور أول عقدة (Lindblad & Sigvald, 2004)

١.٢.٣. طرائق الانتقال

أكدت جميع الدراسات المرجعية أن فيروس تقزم القمح ينتقل بواسطة نوع واحد من نطاطات الأوراق هو النوع *Psammotettix alienus* Dahlbom، وبالطريقة المثابرة الدوارة (غير المتكاثرة) Circulative (non- propagative) viruses، حيث لا يتضاعف الفيروس ضمن الناقل، ولا ينتقل إلى البيوض (Lindbaled & Arenö, 2002؛ Raatikainen & Vasarainen, 1975؛ Schiemenz, 1969). وتحتاج هذه الحشرات على الأقل ساعتين حتى تكتسب الفيروس من نسغ لحاء النباتات المصابة، ويتبع ذلك فترة كمون(Incubation latent period) بسيطة ينتشر خلالها الفيروس في أمعاء النطاطات، ومنها إلى الغدد اللعابية، أي أن الحشرة تصبح قادرة على نقل الفيروس بعد حوالي يوم واحد من التغذية. أما بالنسبة لفترة مثابرة الفيروس ضمن الناقل(Retention period) فهي تتراوح بين بضعة أسابيع وقد تستمر طيلة حياة الحشرة (Vacke, 1972). يمتلك الناقل جيلين في العام، ويكون طور التشتية بطور البيضة ضمن التربة (Schiemenz, 1969)، لتفقس الحوريات في الربيع وتمر بخمس مراحل تطورية قبل الوصول لطور البالغة في أوائل الصيف (Giustina *et al*., 1991؛ Gugielmino & Viral, 1997)، بينما تظهر بالغات الجيل الثاني في أواخر الصيف وتبقى حتى أواخر الخريف، لتدخل بعدها في طور التشتية مع انخفاض درجة الحرارة تحت درجة الصفر (Lindblad & Arenö, 2002). تفضل هذه الحشرة الأراضي العشبية قليلة الرطوبة، حيث يبدأ نشاطها عند درجة حرارة ١٨°س ويزداد النشاط مع ازدياد درجة الحرارة (Ossiannilsson, 1983)، وأظهرت دراسة

أجريت في ألمانيا عامي ٢٠٠٠ و٢٠٠١ أن هناك علاقة طردية بين أعداد الحشرات المتواجدة ونسبة الإصابة بالفيروس ضمن الحقل الواحد (Manurung *et al*., 2004).
لا ينتقل الفيروس بالعدوى الميكانيكية، أو بحشرات المنّ، ولا بالتربة، ولا بحبوب اللقاح أو بالبذور (Lindsten *et al*., 1980). ولم تستطيع النطاطات التالية نقل الفيروس: *Javesella pellucida* Fabr.، *Laodelphax striatellus* Fallen و *Macrosteles laevis* Ribaut (Ossiannilsson, 1983).

٤.٢.١. التوزع الجغرافي والأهمية الإقتصادية

يتواجد الفيروس في أجزاء عديدة من أوربا نذكر منها: تشيكوسلوفاكيا (Vacke, 1961)، بلغاريا (Bakardjieva *et al*., 2004)، هنغاريا (Bisztray & Ga□borja□ni, 1989)، فرنسا (Bendahman *et al*. ,1995)، إيطاليا (Rubies *et al*., 1995)، ألمانيا (Huth, 2000)، رومانيا (Jilaveanu & Vacke, 1995)، السويد (Lindsten & Lindesten, 1999)، بولندا (Jezewosk, 2001)، فلندا (Lemmetty & Huusela, 2005)، اسبانيا (Achon *et al*., 2006)، سلوفاكيا (Bukvayová *et al*., 2006) وتركيا (Köklü *et al*., 2004). أما خارج أوروبا فقد سجل الفيروس في كل من تونس (Najar *et al*., 2000)، زامبيا (Kapooria & Ndunguru, 2004) والصين (Xie *et al*., 2007).

تُعدُ الأوبئة التي سببها الفيروس في الموسم ١٩٩٧/١٩٩٦ في السويد أكبر مثال على الأهمية الاقتصادية لهذا الفيروس، حيث وصلت نسبة النقص إلى ٨٠% في الغلة لمحصول القمح الشتوي في بعض الحقول (Lindblad & Waern, 2002؛ Lindblad *et al*., 1999).

٥.٢.١. طرائق الكشف

بالإضافة للأعراض الظاهرية التي يسببها فيروس تقزم القمح، مداه العوائلي، وتخصصية طريقة إنتقاله والتي يمكن أن تدل على وجود الفيروس بشكل مبدئي (Vacke, 1972)، فإن هناك طرائق أخرى أكثر دقة للكشف عنه. يمكن استخدام اختبار اليزا (ELISA) واختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA) في الكشف عن الفيروس (Bendahman *et al*., 1995؛ Najar *et al*., 2000)، كما يمكن الكشف عنه بواسطة اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) باستخدام بادئات متخصصة (Kvarnheden *et al*., 2002؛ Oluwafemi, 2006). كما أمكن استخدام المجهر الكتروني في الكشف عن الفيروس (Lindesten *et al*., 1980).

١.٢.٦. الوقاية من الفيروس والحد من انتشاره

دلت العديد من الأبحاث أن الوقاية من فيروس تقزم القمح ترتكز على عدة محاور هي المعاملات الزراعية (التخلص من الأعشاب النجيلية التلقائية التي تعتبر كعائل بديل للناقل الحيوي، التبكير أو التأخير في الزراعة)، واستخدام المبيدات الحشرية (Arenö, 1999؛ Mehner *et al*., 2003؛ Vacke & Cibulka, 1999)، واستخدام أصناف مقاومة (Bukvayov□a *et al*., 2006; Benkovicsab *et al*, 2010).

١.٣. حياتية وبيئة نطاطات الأوراق

تنتمي نطاطات الأوراق للعائلة *Cicadellidae* والرتبة *Hemiptera*، وتتميز بأجزاء فمها الثاقبة الماصة وبوجود صفوف من الأشواك الحسية (أشعار) في الطرف الخارجي للساق. تتواجد نطاطات الأوراق في جميع المناطق التي يتواجد فيها نباتات وعائية بما فيها الصحاري، الأراضي العشبية، أراضي المستنقعات والغابات، وعليها يعزى التنوع الكبير لهذه النطاطات بسبب القدرة الكبيرة الموجودة لدى نطاطات الأوراق على التكييف مع البيئات المختلفة (Linnavuori, 1972).

١.٣.١. دورة حياة نطاطات الأوراق

تملك نطاطات الأوراق جيلاً أو أكثر في السنة، وتمر الحشرة خلال دورة حياتها (التي تستغرق ٣٠-٦٠ يوم وذلك بإختلاف الأنواع، والظروف البيئية، وتطور العائل) بسبعة مراحل تطورية تتضمن طور البيضة وطور البالغة وخمسة أعمار حورية. أما طور التشتية فيختلف حسب الأنواع، حيث تشتي معظم أنواع نطاطات الأوراق بطور البيضة وتتوضع البيوض المشتية غالباً ضمن الأنسجة النباتية لتفقس في وقت متأخر من الربيع مع ارتفاع درجات الحرارة (Delong, 1948). كما وجد أن هناك بعض الأنواع تقضي فترة التشتية بطور البالغة ضمن الأوراق القريبة من سطح التربة، أو الأوراق المتعفنة، أو تحت قشرة اللحاء المتشققة لبعض الأشجار، وعادةً ينتهي طور التشتية بأول يوم دافئ من فصل الربيع، وتبدأ البالغات الخارجة من طور التشتية بوضع البيض مباشرة في حال تطور أوراق العائل. تشير المشاهدات والتجارب الحقلية على أن الحشرات المشتية لأنواع الجنس *Nephotettix ssp.* تصبح نشطة بمجرد ارتفاع درجات الحرارة متجاوزة ١٧ °س، حيث تهاجر إلى الحقول العشبية ليتوالد الجيل الأول قبل أن تنتقل إلى حقول الأرز في حزيران وتموز (Chowdhury & Biswas, 1997).

حشرات النطاطات عادة ثنائية الجنس بالرغم من أن النوع *Agallia quadripunctata* Provancher يتوالد (يتكاثر) بكرياً (Black & Oman, 1947). حيث تتزاوج نطاطات الأوراق عادة على السطح السفلي للأوراق وأحياناً على السطح العلوي في المناطق الظليلة. تلعب الظروف البيئية كدرجة الحرارة والرطوبة والإضاءة دور في تحديد وقت التزاوج. تظهر عادة الذكور قبل الإناث ويحدث التزاوج خلال بضعة أيام بعد ظهور الإناث، حيث تُظهر الذكور بعض النشاطات قبل التزاوج تتمثل بأصوات خاصة لها أهمية جنسية، كذلك فإن كلاً من الذكور والإناث يؤدون رقصة معينة تدوم لبضع دقائق قبل التزاوج، وبعد فترة قصيرة من المغازلة فإن كلا الجنسين يتزاوج بوضعية تقارب الذيل من الذيل (Ahmed *et al*, 1989)، تبدأ الإناث بوضع البيض خلال ١-٣ أيام بعد التزاوج وتختلف أعداد البيض الموضوع باختلاف الأنواع، حيث تضع الأنثى الواحدة عادةً ١-١٠ بيضة، يتوقف عدد البيوض الإجمالي التي تنتجها الأنثى الواحدة في مختلف الأنواع على طول عمر الأنثى الملقحة، فالعدد الأقصى للبيوض الموضوعة من قبل أنثى واحدة هو ١٥٠ بيضة. توضع البيوض ضمن الأنسجة النباتية وخلال عملية وضع البيض فإن الأنثى تدخل آلة وضع البيض إلى طبقة البشرة (الأدمة) لسطح الورقة السفلي على طول الضلع الأوسط وتستقر بيضة واحدة في كل ثقب، لكن في بعض الأحيان توضع البيوض على شكل مجموعات. وترتبط فترة حضانة البيض بدرجة الحرارة حيث تمتد من ٤-٦ أيام، بعدها يلاحظ انبثاق الطور الحوري الأول والذي يبدأ التغذية مباشرة، وتبدأ التغيرات الخارجية بالتطور من خلال زيادة في الحجم وظهور الأجنحة وأعضاء التناسل لتظهر البالغات بعد خمسة انسلاخات متتالية (Chiykowski & Sinha, 1970).

بينت التجارب أنه عند درجة حرارة معينة إنّ معدل أعمار الذكور قصير بالمقارنة مع الإناث، وأن الذكور الملقحة تموت بشكل أسرع من الذكور غير الملقحة، كما درست النسبة الجنسية (ذكور/إناث) لأنواع مختلفة من نطاطات الأوراق في المروج الطبيعية وتبين أن الظروف المناخية تلعب العامل المحدد الأكبر لهذه النسبة، حيث أظهرت تلك الدراسات مقاومة أكبر من قبل الإناث على تحمل التغيرات المناخية، وكذلك فإنه تحت ظروف مثالية كانت نسبة الإناث أكبر ضمن الجيل الواحد (Dmitriev, 2002).

يتم التواصل بين نطاطات الأوراق عن طريق إصدار أصوات خاصة تخرج من أعضاء في قاعدة البطن تدعى طبلات، تكون هذه الأصوات خفيفة لا تسمع بواسطة أذن الإنسان بل تحتاج أجهزة تضخيم (Novone, 1987).

١.٣.٢. أسلوب تغذية نطاطات الأوراق والأضرار الناتجة عنها

تعد حشرات نطاطات الأوراق نباتية التغذية بما تمتلكه من أجزاء فم ثاقبة ماصة تعتمد عليها في التغذية عن طريق ثقب طبقة البشرة لضلع الورقة الطرية من السطح السفلي وامتصاص العصارة، بينما تبدي البالغات رغبة في التغذية على السطح العلوي بعكس الحوريات مع التوافق بينهما في ندرة التغذية على الساق والأفرع. تعتمد هذه الحشرات بالعادة في تغذيتها على نسيج الميزوفيل (نسيج الورقة الوسطي) الذي تخترقه أجزاء الفم وتبدأ بامتصاص العصارة النباتية، مسببةً تنقطات بيضاء تظهر على الورقة، تدل هذه العلامات على المناطق التي تحولت فيها الخلايا إلى خلايا ميتة، كما أن بعض الأنواع تعمل على إحداث ثقب عميق في النسيج يسبب إغلاق ميكانيكي لأوعية الخشب واللحاء (Osborn, 1932). كما لوحظ في بعض الحالات أن الخلايا الميتة نتيجة تغذية حشرة النطاط قد تحولت إلى اللون الأصفر، هذه المنطقة من الخلايا ميتة يطلق عليها اسم Hopper burn، يمكن أن تعزى إلى تأثير سمي للعاب الحشرة، حيث وصف Lee عام (١٩٨٣) الــ Hopper burn على أوراق البطاطا التي تسببها أنواع الجنس *Empoasca* حيث يتحول لون منطقة الإصابة إلى اللون الأسمر الغامق ثم تتجعد وتلتف، قد تكون الإصابة في قمة الورقة أو على طول حافة الورقة. كذلك فقد وصف Janjua and Chaudry (١٩٦٤) الأعراض التي تسببها حشرة (Poli) *Empoasca decepiens* والتي تُعدّ إحدى آفات العنب، حيث لاحظا بأن الأوراق الفتية تكون أكثر عرضة للإصابة، وعندما يكون هناك عدة إصابات فإن عروق الورقة تبدأ بالاضمحلال، ومن ملاحظاتهما أيضاً أن الأنواع التي تستخدم للتخمير والتي تتميز بكمية أكبر من المحتويات السكرية تصاب بشكل أكبر. وتعد الحشرة *Amrasca devastans* أحد آفات القطن حيث تؤثر على النمو من حيث طول النبات، إنتاج الأزهار، حجم جوزات القطن، والصفات التكنولوجية للخيط، فعندما ترتفع نسبة الإصابة في النبات فإن الأوراق تتأثر بشكل كبير بالسائل المفرز من قبل الحوريات والذي يشكل بيئة مناسبة لانتشار الأعفان، ومن أشهر الفطور المعروفة والمنتشرة على هذا السائل هو فطر Brown Dust (*Botrytis sinerea*) الذي ينمو على الأوراق في المناطق المثقوبة من قبل حشرات النطاطات، انتشار هذه الفطور يشكل عائق أمام استمرارية تغذية الحوريات على النبات المصاب، مما يشكل دافع حقيقي للبحث عن مصدر غذائي بديل (Bhat *et al*,. 1982).

١.٣.٣. المدى العوائلي لنطاطات الأوراق

تملك الحشرة ثلاث أنواع من العوائل: العوائل الرئيسية (Principal host plants) هي تلك النباتات التي تستخدمها حشرات النطاطات لوضع البيوض وتطور الحوريات عليها، أي تتم النطاطات دورة حياتها بشكل كامل، وتتغذى عليها بكميات كبيرة، العوائل البديلة (Alternate host plants) وهي تلك

النباتات التي تلجأ إليها حشرات النطاطات عندما لا يتوفر العائل الرئيس، ومن الملاحظ أن تغذية وتكاثر حشرات النطاطات على هذه النباتات يكون بالحدود الدنيا ريثما يتوفر العائل الرئيس. عوائل التغذية أو ما يسمى (Food plants)، حيث أن شح الغذاء في المناطق الجافة يدفع حشرات النطاطات للتأقلم مع هذه البيئة عن طريق التغذية على هذا النوع من النباتات، والتي تشكل مصدر الحياة والبقاء لهذه الحشرات وعلى الرغم من أنها تستخدم فقط للتغذية وليس لوضع البيض واستكمال الحياة بسبب سرعة جفاف هذه النباتات وعدم ملائمتها لعملية وضع البيض (Hunter *et al,*. 1989).

تلعب طبقة البشرة لأوراق النبات دوراً رئيسياً في اعتماده كعائل رئيس لحشرات النطاطات، حيث أن النباتات المحتوية على أوراق ذات طبقة بشرة ناعمة تكون أكثر ملائمة لإستكمال دورة حياة النطاط وذلك بسبب ما توفره من سهولة للإناث في حقن حامل البيض ضمن خلايا النسيج الحشوي للورقة حيث تتوضع البيوض، ويمتد دور طبقة البشرة حتى إلى فترة ما بعد نضج البيوض وظهور الحوريات بالأعمار الأولى، حيث يجب أن يكون طرياً بقدر كافي للتمكن حوريات الأعمار الأولى من التغذية عليه. لا تلعب الأشعار الموجودة على سطح الأوراق أي دور في انتخاب أصناف مقاومة لحشرات النطاطات، لكن سجل أن ثخانة طبقة البشرة يلعب دور رئيسي في تحديد الأصناف المقاومة من خلال تحديد الغذاء وعملية وضع البيض (Husain & Lal, 1940).

تملك حشرات النطاطات مدى عوائلي واسع، حيث تشكل المروج الطبيعية أكبر نسبة من العوائل المدروسة لهذه الحشرات في جميع أنحاء العالم. وتلعب هذه المروج دوراً كمصدر دائم لهذه الأنواع الحشرية في فترة غياب المحاصيل الزراعية كالأرز والقمح والذرة لتعود وتغزو هذه المحاصيل في موسم النمو (Blocker *et al*,. 1995؛ Genung & Mead, 1969؛ Theron, 1982).

١.٣.٤. الأعداء الحيوية للنطاطات الأوراق

بما أنها أحد أهم وأشهر المجموعات الحشرية النباتية لذلك فإن نطاطات الأوراق هي غذاء مهم للحيوانات الفقارية مثل: الطيور، السحالي، وكذلك الحيوانات غير الفقارية مثل: العناكب، البعوض القاتل، الدبابير، والذباب السارق، كذلك فإن نطاطات الأوراق تُهاجم أيضاً من قبل متطفلات حشرية متنوعة مثل: *Epipyropid moths*، *Mymarid wasps*، *Dryinidstrep sipterans* و *Pipunculid flies*. لم تسجل أية إشارات على أن نطاطات الأوراق حساسة للإصابة بالفيروسات والبكتريا والأوالي الحيوانية، بينما تُعدّ الفطور (الأمراض الفطرية) هي من أهم ممرضات نطاطات الأوراق (Kirkaldy, 1906).

٤.١. أهمية نطاطات الأوراق كنواقل حيوية للأمراض الفيروسية

تُعدّ نطاطات الأوراق (Leafhopper) التابعة للعائلة *Cicadellidae* من النواقل الحيوية المهمة للفيروسات النباتية بعد حشرات المنّ والذباب الأبيض، فهي ناقلة لحوالي ٣٢ فيروس نباتي (Nault & Ammar, 1989)، وتعد نطاطات الأوراق هي أولى النواقل الحيوية التي أثبت فاعليتها في نقل الفيروسات النباتية، وذلك من خلال دراسة نقل النوع *Recelia dorsalis* من نطاطات الأوراق لفيروس تقزم الأرز (*Rice dwarf virus*) في حقول الأرز اليابانية (Fukushi, 1940).

يتواجد حوالي ١٠٠.٠٠٠ نوع من نطاطات الأوراق، معرّف منها حوالي ٢٠.٠٠٠ نوع فقط (Dietrich, 2005)، سجل منها ٤٩ نوع تتبع ٢١ جنس كنواقل للفيروسات النباتية، أغلبها فيروسات تصيب المحاصيل النجيلية وتسبب خسائر اقتصادية كبيرة (Jonse *et al.*, 2000؛ Nault & Ammar, 1989؛ Nielsion, 1979, 1985). تتمتع نطاطات الأوراق بمدى عوائلي واسع وهذا يعكس مدى أهميتها بوصفها نواقلاً للأمراض الفيروسية على العديد من المحاصيل الزراعية الهامة ومنها: القمح، الشعير، جوز الهند، الأرز، البطاطا، الذرة، الشوندر السكري، ....الخ (Michael, 2007)

١.٤.١. عوامل التخصص في النقل الفيروسي عند نطاطات الأوراق

يلعب التركيب الداخلي لحشرة نطاطات الأوراق دوراً فعالاً في تحديد العلاقة التخصصية بين الحشرة والنوع الفيروسي الناقلة له، ولعل أهم ما يحدد هذه العلاقة النقاط الآتية:

١.١.٤.١. الغدد اللعابية لنطاطات الأوراق

تلعب الغدد اللعابية دوراً هاماً في عملية التخصص للنقل الفيروسي عند نطاطات الأوراق، حيث تتألف كل غدة من أربع فصوص غدية أساسية، وغدة مساعدة (إضافية) تتألف بدورها من خمس أنواع مختلفة من خلايا عنبية الشكل وهي غدد خارجية الإفراز (Nault & Ammar, 1989)، وتعتبر الغدد اللعابية أحد عوامل التخصص في نقل بعض الفيروسات بواسطة النطاطات كما هو الحال مع فيروس تخطط الذرة (Maize streak virus)، فقد ثبت باستخدام اختبار الإليزا (ELISA) أن بعض أفراد نوع نطاط النبات *Cicadulina.mbila* (الناقل لفيروس تخطط الذرة) تحتوي غددها اللعابية على هذا الفيروس، دون أن تستطيع نقله عند التغذية على نبات سليم، ويدل ذلك على أن هذا الفيروس قد

يستطيع غزو الغدد اللعابية، بل وربما التكاثر فيها دون أن يستطيع الخروج منها (مع اللعاب) أثناء عملية التغذية، وهناك احتمال آخر هو أن هذا الفيروس قد يستطيع الخروج مع اللعاب لكنه قد يتم تثبيطه بواسطة بعض الإنزيمات أو المكونات الأخرى في اللعاب (Nault & Ammar, 1989).

١.٤.١.٢. القناة الهضمية لنطاطات الأوراق

تتألف القناة الهضمية عند نطاطات الأوراق من ثلاث مناطق رئيسية هي: المعي الأمامي، المعي المتوسط والمعي الخلفي. وتدل العديد من الأبحاث على أن القناة الهضمية لحشرات النطاطات قد تكون أحد أهم الحواجز التي تمنع أو تسمح للحشرة بأن تنقل فيروسات مثابرة معينة دون أخرى، سواء أثناء محاولة الفيروس الدخول من تجويف القناة الهضمية إلى خلاياها بعد التغذية على النبات المصاب، أو أثناء خروج الفيروس من تلك الخلايا إلى تجويف السائل اللمفاوي للحشرة، ومن الأمثلة على ذلك فيروس موزاييك الذرة (Maize mosaic virus) حيث تمكن ٨٥% من أفراد نطاط النبات *P. maidis* من نقل الفيروس عندما حقن في سائلها اللمفاوي، بينما تمكن ٣٠-٤٢% فقط من الأفراد نقله بعد تغذيتها على نبات المصاب (Ammar *et al*., 2005). وفي حالة فيروس التورم الجرحي للبرسيم (Clover wound tumor virus) فمن المعروف أن كفاءة حشرة نطاط الأوراق الناقلة له تقل كلما زاد عمر الحشرة، ورغم ذلك أمكن زيادة كفاءة النقل بثقب القناة الهضمية للحشرات كبيرة السن أثناء تغذية الاكتساب (Nuss, 1984). يبدو أن قابلية خلايا القناة الهضمية أو الغشاء المبطن لها (والتي تلعب دور في السماح بمرور الفيروس أو إكثاره) تقل بازدياد عمر الحشرة الناقلة.

١.٤.١.٣. الحمض النووي للفيروس

أمكن تجريبياً تحويل أحدى سلالات فيروس التورم الجرحي للبرسيم (WTV) المنقولة بواسطة نوع محدد من نطاطات الأوراق إلى سلالة لا يمكن نقلها بتلك النطاطات، وذلك بإكثار الفيروس لفترة طويلة داخل العائل ونقله بواسطة التكاثر الخضري فقط، حيث وجد أن فقد تلك السلالة لخاصية النقل بالحشرات يرتبط لفقد المورثتين رقم ٢ و٥ من الحض النووي dsRNA للفيروس المكون من اثنتي عشر قطعة (Segments). كما وجد أن هاتين المورثتين مسوؤلتان عن تشفير الغلاف البروتيني للفيروس، مما يدل على أهمية هذا الغلاف، في عملية الارتباط مع أنسجة القناة الهضمية أو الغدد اللعابية للحشرة الناقلة حتى يمكنه إصابتها والتكاثر داخلها (Nusss, 1984). والجدير بالذكر أن بروتين ج (Protein G) وهو أحد مكونات الغلاف البروتيني لفيروسات عائلة *Rhobdoviridae*، ومنها فيروس التقزم الأصفر للبطاطا/البطاطس (Potato yellow dwarf virus) الذي تنقله عدة أنواع من

نطاطات الأوراق، يلعب هذا البروتين دوراً هاماً في التصاق هذه الفيروسات بالغشاء البلازمي المحيط بالخلايا حتى يمكن اصابتها (Jackson *et al*., 1999).

١.٤.١.٤. تركيب سائل الأوعية اللمفاوية لحشرة نطاطات الأوراق

يلعب سائل الأوعية اللمفاوية (Hemolymph) دوراً في تسهيل أو إعاقة انتشار الفيروس خلال التجويف الدموي للحشرة الناقلة حتى وصوله إلى الغدد اللعابية، فقد وجد أن عدداً من الفيروسات المتكاثرة، ومنها فيروس موزاييك الذرة (MMV)، تتكاثر في خلايا دم الحشرات الناقلة لها (Ammar *et al*., 2005).

٥.١ طرائق نقل الفيروسات النباتية بواسطة نطاطات الأوراق

١.٥.١. الطريقة شبه الباقية/شبه المثابرة (Semi-persistent)

نذكر على سبيل المثال فيروس التقزم الشاحب في الذرة (Maize chlorotic dwarf virus)، حيث أكدت الدراسات أن فترتي الاكتساب والإلقاح للفيروس بواسطة نطاط الأوراق *Graminello nigriifornds*، هي حوالي ١٥ دقيقة (Choudhury & Rosenkranz, 1983). يقدر هذا الوقت بالزمن اللازم لاختراق حشرة النطاط لخلايا العائل والوصول إلى الخلايا اللحائية. تفقد حشرة نطاط الأوراق القدرة على نقل فيروس التقزم الشاحب في الذرة (MCDV) خلال أقل من ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٢٥ °س، بينما تبقى لعدة أيام في درجات الحرارة المنخفضة. لا توجد فترة حضانة (كمون) مؤكدة للفيروس داخل الحشرة الناقلة، حيث أن الحشرة عادة تبدأ في نقل الفيروس بعد انتهاء تغذية الاكتساب مباشرة. تفقد الحوريات القدرة على نقل الفيروس بعد الانسلاخ كما تبدي ذكور وإناث النطاطات قدرة على نقل فيروس تقزم وإصفرار الذرة مع وضوح فعالية أكبر في النقل للإناث (Hunt *et al*., 1988). تدل الدراسات بالمجهر الإلكتروني على أن فيروس تقزم واصفرار الذرة يوجد على السطح الكيتيني المبطن لقناة الغذاء الموجودة بالفكوك الرمحية السفلية بالإضافة إلى وجوده على الأسطح المبطنة لمضخة الامتصاص (cibarium) والبلعوم، وهي أجزاء من القناة الهضمية الأمامية (Foreaut) لحشرات نطاط الأوراق الناقلة له (Ammar & Nault, 1991).

٢.٥.١. الطريقة الباقية/المثابرة (Persistent)

تصل الفيروسات المكتسبة بهذه الطريقة إلى الغدد اللعابية ثم تفرز مع اللعاب أثناء تغذية الحشرة على النبات. يمكن للفيروس أن يتضاعف ضمن ناقله أو لا يتضاعف وبناء على ذلك تم تقسيم هذه الطريقة من النقل إلى :

١.٢.٥.١. الطريقة الباقية/المثابرة الدوارة (غير المتكاثرة) Circulative (Non-propagative)

هناك جنسين من العائلة *Geminiviridae* هما *Mastreviruses* و*Curtoviruses* تنقلها نطاطات الأوراق بالطريقة المثابرة الدوارة (غير المتكاثرة) وهناك نوع من التخصص حيث أن كل فيروس ينقله على الأغلب ناقل رئيسي واحد، على سبيل المثال فيروس تخطط الذرة (MSV) ينقله النطاط *Cicadulina mbila*. تتميز هذه الطريقة بخصائص أهمها أن فترة الاكتساب تتراوح من عدة ثواني إلى ساعة كما أن فترة الحضانة (أو الكمون) للفيروس داخل الحشرة الناقلة تتراوح ما بين ٢٣±٤.١ ساعة، وهو الوقت اللازم لوصول الفيروس إلى الغدد اللعابية بعد اختراقه لخلايا القناة الهضمية الوسطى لتمر إلى تجويف الجسم حيث يساعد الدم على انتشارها حتى تصل إلى الغدد اللعابية (Ammar & Nault, 1991).

حظي فيروس تخطط الذرة (MSV) التابع للعائلة *Geminiviridae* بدراسات مطولة، حيث أكدت الدراسات وجود الفيروس في الأنسجة الوسطية لأوراق نباتات الذرة المصابة، ويمكن لحشرة نطاط الأوراق اكتساب الفيروس بالتغذية على هذه الأنسجة، ولكن لا يمكن لهذه الحشرات إلقاحه في نسيج اللحاء، كما وجد أن الفيروس يمر إلى السائل اللمفاوي من خلال غرفة الترشيح، وهي جزء من القناة الهضمية الوسطية (وليس من القناة الهضمية الخلفية)، حيث تتواجد مستقبلات متخصصة في القناة الهضمية للحشرة الناقلة تلعب دوراً هاماً بعملية النقل (Bosque-perez, 2000). بعض أنواع الجنس *Cicadulina* التي لا تنقل فيروس تخطط الذرة عادة، أمكن تحويلها إلى حشرات ناقلة وذلك بثقب القناة الهضمية الوسطى (بإبرة دقيقة) قبيل اكتساب الفيروس من النبات المصاب، كما أن هذه الأنواع غير الناقلة يمكنها نقل ذلك الفيروس إذا حقن في السائل اللمفاوي مباشرة دون التغذية على النبات المصاب، وقد أمكن إثبات أهمية الغطاء البروتيني للفيروسات التوأمية الشكل في عملية النقل بالحشرات وفي التخصص بين النوع الناقل والفيروس، وذلك باستخدام ظاهرة الخلط المظهري المشار إليه سابقاً، فقد أمكن إحداث تبادل للغطاء البروتيني بين فيروس موزاييك الكاسافا الإفريقي (African cassava mosaic virus) الذي تنقله حشرات الذباب الأبيض من جنس *Bemisia* وفيروس تجعد قمة الشوندر السكري/البنجر (Beet curly top virus) الذي تنقله نطاطات الأوراق من جنس *Cirenlifer*، وذلك

عندما حقنت نطاطات الأوراق بفيروس تجعد قمة الشوندر السكري/البنجر الذي يمتلك الغطاء البروتيني لفيروس موزاييك الكاسافا الإفريقي، حيث أمكن لهذه النطاطات نقل أعراض فيروس موزاييك الكاسافا الإفريقي إلى النباتات التي تغذت عليها (Briddon *et al.*, 1990).

١.٥.٢.٢. الطريقة الباقية/المثابرة المتكاثرة (Propagative viruses)

تُعرف الفيروسات المتكاثرة بأنها تلك التي يمكنها التكاثر داخل خلايا وأنسجة الحشرات الناقلة لها وتتشابه في خصائصها مع الخصائص المميزة لطريقة نقل الفيروسات بالطريقة المثابرة/ الباقية. تقدر فترة الحضانة (الكمون) والبقاء للفيروسات المتكاثرة داخل حشراتها الناقلة ٣٦٨±٤١ ساعة
(Ammar & Nault, 1991)، وهي أطول بكثير مما هو عليه في حالة الفيروسات الدوراة (غير المتكاثرة)، ويعود ذلك إلى الفترة اللازمة لتكاثر الفيروس داخل أنسجة الحشرة الناقلة قبل وصوله إلى اللعاب حيث يفرزان معاً أثناء تغذية الحشرة على النبات. كما أنه في الفيروسات المتكاثرة عادة ما تبقى داخل الحشرة الناقلة طوال حياتها بعد انتهاء فترة الكمون بل إنها تستطيع في بعض الحالات نقل الفيروس رأسياً عن طريق البيض إلى جيل أو أجيال تالية. تنقل نطاطات الأوراق حوالي ٤٣ فيروساً متكاثراً للنباتات، يتبع ثلاث منها جنس *Marafivirus* و ١٣ فيروساً من فصيلة *Reoviridae* و ٢٧ فيروساً من فصيلة *Rhabdoviridae* (Nault, 1997).

١.٦. العوامل المؤثرة في تضاعف ومثابرة الفيروس داخل حشرة نطاطات الأوراق الناقلة

١.٦.١. عمر نطاط الأوراق عند العدوى

أثبتت الدراسات على العديد من أنواع النطاطات تحت الظروف التجريبية بأن الحوريات هي أكثر فعالية بوصفها نواقلاً للفيروسات من البالغات، وحتى البالغات تتناقص كفاءة نقلها مع تقدم العمر، حيث استطاع Sinha (1967) إثبات وجود جسيمات فيروس التورم الجرحي للبرسيم (WTV) ضمن حوريات وبالغات النطاط *A. constricta* بعد يوم من تغذية الاكتساب، ولكن بعد ٣٢ يوماً من العدوى وجد أن ٥٠% من الأفراد المصابة كحوريات ما زالت تملك جسيمات الفيروس في تجويف الجسم والغدد اللعابية، أما بالنسبة للأفراد المصابة كبالغات فقد وجد أن ٥% فقط تملك تلك الجسيمات، واقترح بأنه مع تقدم العمر يصبح المعي المتوسط غير قابل للإصابة أو اكتساب الفيروس، كما أن الفيروس الموجود في غرفة الترشيح لا يستطيع المرور إلى تجويف الجسم (Sinha, 1967).

١.٦.٢. فترة بقاء الفيروس داخل الحشرة الناقلة (Retention period)

أظهر Slykhuis (١٩٦٣) أن النطاط *Endria inimica* يفقد القدرة على نقل فيروس تبرقش الحشيشة (Ascalepies mosaic virus) بعد فترة اكتساب تراوحت من بضع أيام إلى ٧٢ يوماً.

١.٦.٣. درجة الحرارة

درس Sinha (١٩٦٧) تأثير زيادة درجة الحرارة على انتشار الفيروس فيروس ورم الجروح للبرسيم في الناقل *A. constricta* وذلك على مجموعتين من الحوريات، المجموعة الأولى أعطيت الغذاء الحاوي على الفيروس ولمدة يوم واحد عند درجة حرارة ٢٧ °س، واحتجزت بعد ذلك عند درجة حرارة ٧ °س لمدة ٣ أيام، فوجد بأن الفيروس وصل إلى غرفة الترشيح في المعي المتوسط، أما المجموعة الثانية فعوملت بنفس المعاملة تماماً لكن عند درجة حرارة ٣٦ °س، وكانت النتيجة أن الحرارة المرتفعة منعت انتشار الفيروس من المعي الأوسط إلى تجويف الجسم والغدد اللعابية (Sinha, 1967).

١.٦.٤. التغيرات أو الاختلاف الجيني بين أنواع نطاطات الأوراق

قد يطرأ تغير جيني على إحدى أنواع النطاطات يكون له تأثير سلبي على النقل الفيروسي (Dmitriev, 2009).

١.٧. صفات نطاط الأوراق *Psammotettix provinicialis* (Ribaut, 1925)

١.٧.١. التصنيف العلمي

يتبع نطاط الأوراق *Psammotettix provinicialis* (Ribaut, 1925) لرتبة متشابهة الأجنحة *Homoptera* وفصيلة نطاطات الأوراق *Cicadellidae* تتميز حشرات هذه الفصيلة بأنها صغيرة الحجم ذات جسم مغزلي أو مثلثي الشكل ذات ألوان وأحجام مختلفة، تتميز الساق الخلفية بوجود صف أو أكثر من الأشواك الصغيرة، الحرقفة الخلفية مستعرضة، الغدة خلف درقية متضخمة، قرن الاستشعار صغير، منتصف الورك مفصلي ضيق، ولا يلاحظ وجود واضح لشعيرات حسية وحركية (كعكة، ١٩٨٨).

يتواجد حوالي ٥٠ نوعاً يتبع لجنس *Psammotettix* (Greene, 1971) تملك هذه الأنواع العديد من الصفات المتقاربة والتي تجعل تصنيفها على مستوى النوع فيه شيء من الصعوبة ولذلك ٩٠% منها غير معرّفة (Dietrich., 2005)، وتعتبر الأعضاء التناسلية من أهم المفاتيح التصنيفية المعتمدة للتفريق بين أنواع الجنس *Psammotettix* (Greene, 1971)، فقد تكون شوكة السفاد عند الذكور كاملة أو مسننة، أو تكون متناسقة (متماثلة) أو غير متناسقة، وذلك من خلال المنظر الظهري، وقد تكون مستقيمة أو متعرجة بالإعتماد على المنظر الجانبي. كما أن ارتباط شوكة السفاد بالجسم يختلف بين الأنواع فقد تأخذ شكل حرف Y أو تكون رفيعة ومستدقة، وكذلك فإن للنهاية الذيلية لشوكة السفاد دور في تصنيف الأنواع التابعة للجنس *Psammotettix* فقد تكون مبتورة أو مسننة، أما عند الإناث فقد يلعب شكل ونوع البيض دوراً في تصنيف هذه الأنواع (Greene, 1971).

٢.٧.١. الانتشار الجغرافي

تصيب هذه الحشرة العديد من نباتات العائلة النجيلية في منطقة الباليرتك (Palaearctic)، والتي تضم كلاً من أوربا، أسيا، والجزء الشمالي من افريقيا. حيث سجل وجود هذا النوع في بلغاريا، أفغانستان، الصين، قبرص، تشيكسلوفاكيا، فرنسا، اليونان، هنغاريا، إيران، ايطاليا، برتغال، روسيا، يوغسلوفاكيا، بالإضافة لمعظم مناطق تركيا (Dlabola, 1957؛ Kalkandelen, 1974؛ Matcalf, 1967؛ Ribaut, 1938؛ Zachvatkin, 1933).

٣.٧.١. الوصف المورفولوجي

جسم الحشرة اسفيني الشكل بأجنحة مطوية ومثنية وعالقة فوق الظهر ذات لون رمادي إلى بني، يتراوح طول الذكور بين ٣.٨-٤.٢ مم، بينما يتراوح طول الإناث بين ٣.٩-٤.١ مم، يتراوح عرض الرأس بين ١-١.١ مم متضمناً الأعين في كلا الجنسين. طول التاج في مقدمة الرأس تراوح بين ١.١-١.٥ مم مع وجود دروز حقيقية ميزابية الشكل تمتد من الجهة الأمامية للرأس وبطول حوالي ٠.٧-٠.٨ مم، يلاحظ وجود تخططات طولية بنية اللون مع وجود خطين جانبيين بلون برتقالي على ترجة الحلقة الصدرية الثامنة، كما نلاحظ أن عروق الأجنحة الخلفية بدون لون. يتراوح طول الصفيحة الظهرية الأمامية بين ١.٣-١.٦ مم. ويلاحظ بأن نقر قرون الاستشعار تكون دائرية الشكل في منتصف منطقة التاج. أما طرف عضو السفاد (شوكة السفاد) أنبوبي الشكل يمتد داخل قناة مزورقة تشبه الملعقة، ومن خلال منظر ظهري لعضو السفاد نلاحظ وجود حافة لشوكة السفاد بدون أسنان

جانبية. وعند الإناث فإن الصفيحة البطنية السابعة لها طرف خلفي متطاول أو على الأغلب مقطوع (مبتور). والأغشية بين الفصوص واضحة كتجعدات خلال الحلقة الصدرية السابعة (Greene, 1971).

البيوض صغيرة الحجم اهليلجية الشكل مع زائدة أمامية مستدقة والجزء الخلفي مستدير، لون البيض كريمي- أبيض عند عملية وضع البيض لكن خلال التطور الجنيني يتحول للون الأصفر إضافة إلى تغير في حجم البيض أيضاً حيث يبلغ حجم البيض عند عملية الإباضة ٠.١٨-٠.٢٢ × ٠.٢٩-٠.٩٩ مم، بينما يصل حجمها قبل الفقس إلى ٠.٣-٠.٢٦ × ١.٠٧-٠.٩٣ مم، هكذا يلاحظ بأن العرض يزداد أكثر من الطول، حيث تبلغ الزيادة في العرض حتى ٣٧% أما الزيادة في الطول لا تتجاوز ٧%. الحوريات تشبه البالغات في شكل الجسم بشكل عام ما عدا أنها أصغر حجماً وبدون أجنحة ذات لون أصفر إلى أصفر ذهبي. يمكن تمييز الأطوار الحورية عن بعضها البعض بواسطة طول كامل الجسم، طول مقدمة الجسم، طول الصفيحة الظهرية للحلقة الصدرية الوسطى مع أجنحتها، عرض الرأس، عرض الصفيحة الظهرية الأمامية، عدد وتوزع الأشواك على كل جنب من الصفائح الظهرية الثالثة والرابعة، ووفقاً للون حيث أن الحوريات يمكن أن تظهر بلون شفاف أو غامق وكلا الشكلين يتواجد في الحقل (Manrung *et al*., 2004).

١.٧.٤. دورة الحياة

وجد أن لنوع النطاط *Psammotettix alienus* المعروف عنه أنه كناقل لفيروس تقزم القمح عالمياً أنه ذو تشابه مورفولوجي وحياتي مع نوع النطاط *Psammotettix provinicialis* (Greene, 1971) المدروس في هذا البحث له ثلاثة أجيال في السنة (Mehner, 2005) وذلك خلال دراسة مخبرية أجريت على هذا النوع من النطاطات تحت درجة حرارة ٢٠ °س، رطوبة نسبية ٧٠-٩٥%، عدد ساعات إضاءة ١٨ وساعات ظلام ٦، حيث لوحظ وباستخدام المجهر الضوئي وجود سبعة مراحل تطورية للحشرة هي: بيضة، خمسة أطوار حورية إضافة لطور البالغة، وكانت مدة التطور الجنيني هي ١٨.٣ يوماً (تتراوح بين ١٦-٢٤ يوماً) بينما فترة التطور الحوري تدوم ٣٢.٤ يوماً (تتراوح بين ٢٦-٣٩ يوماً)، وفي هذه الحالة فإن فترة التطور الحوري الأول، الثاني، الثالث، الرابع، والخامس، هي بالترتيب ٥.٩ يوماً، ٥.١ يوماً، ٥.٦ يوم، ٦.٣ يوماً، ٩.٤ يوماً، وبالتالي فإن معدل فترة التطور للحشرة من بيضة إلى بيضة هي ٥٨ يوماً (حيث تستغرق ٥١ يوماً من بيضة حتى حشرة كاملة يضاف له ٧ أيام قبل وضع البيض) (Manrung *et al*., 2004).

تشتي الحشرة بطور بيضة حيث تضع الإناث البيض ضمن أوراق الشعير البري وغيرها من النباتات النجيلية خلال الخريف، ويلعب كلاً من طول فترة الإضاءة في النهار ودرجة الحرارة تأثيراً كبيراً في دخول البيض طور التشتية كما تلعب الظروف المناخية دوراً هاماً في تحديد فترة التطور الجنيني والحوري، كما تحدد الظهور الأول للحشرة الكاملة وفترة تواجدها في الحقل وعدد الأجيال لكل عام (Manrung *et al.*, 2004)

١.٧.٥. المدى العوائلي

أكدت الدراسات تواجد هذا النوع من النطاطات وبأعداد كبيرة على العديد من النباتات التابعة للعائلة النجيلية، فقد سجلت على الأرز، الذرة، القمح، الشعير والعديد من الأعشاب البرية النجيلية منها *Stipa* ssp. (Lodos & Kalkandelen, 1987).

١.٧.٦. الضرر وأعراض الإصابة

الضرر الناجم عن هذا النوع من نطاطات الأوراق يكون إما مباشراً عن طريق تغذيها على المحاصيل النباتية بواسطة أجزاء فمها الثاقبة الماصة، أو غير مباشر عن طريق نقلها للعديد من ممرضات النبات (Kersting *et al*, 1997). ومن الأعراض الملاحظة عند تغذية هذا النوع من النطاطات على النباتات وجود نقط صفراء على أوراق هذه النباتات. ومن أهم الفيروسات التي تنقلها هو فيروس تقزم القمح (WDV) (Vacke, 1961).

١.٨. مكافحة نطاطات الأوراق

١.٨.١. رصد النشاط الحشري لنطاط الأوراق

إن انتشار الممرضات النباتية المنقولة عن طريق نطاطات الأوراق تعتمد بشكل أساسي على الظروف البيئية التي تلعب عاملاً محدداً في زيادة أعداد الحشرات الناقلة وحركتها من نبات لآخر وفي الكفاءة التناسلية لهذه النواقل (Hunt *et al* 1988؛ Power, 1987, 1992)، لذلك فإن تقنية رصد النشاط الحشري لنطاطات الأوراق في بداية الربيع تلعب دوراً هاماً في التنبؤ عن الأمراض المتوقع حدوثها وبالتالي اتخاذ التدابير الوقائية اللازمة (Irwin & Ruesink, 1986).

تنجذب نطاطات الأوراق للون الأصفر، ولذلك تستخدم المصائد اللونية الصفراء من أجل مراقبة نشاط وموعد بدء طيرانها، وتتألف هذه المصيدة من طبق (٢٠×٣٠ سم) مطلي بالإيناميل ذي اللون الأصفر يملئ بالماء (Southwood, 1978)، ويتم وضعه فوق الأرض بحوالي ٣٠ سم في أيام الزراعة (طور البادرات) ليرفع أكثر من ذلك مع زيادة نمو النبات (Alverson & Matthews, 1987؛ Mcyedirk & oldfield, 1985؛ Uygun & Baspinar, 1987)

وتستخدم أيضاً مصائد الشفط (السحب) ومن أشهرها Onson-Taylor suction وهي عبارة عن مراوح تدار كهربائياً لتشفط حجماً معيناً في وحدة الزمن يتراوح بين: ٠.٥–١.٥ x 10^5 متراً مكعباً من الهواء (Johson & Taylor, 1965, Alison & Pike, 1988).

١.٨.٢. العمليات الزراعية

الحراثة – تعتبر الحراثة الخريفية قبل الزراعة ضرورية من أجل التخلص من بقايا المحصول السابق وبالتالي القضاء على الحشرات المشتية بأطوارها المختلفة وكذلك التخلص من الأعشاب البرية على أطراف الحقل التي تلعب دور عائل مناوب لهذه الحشرات (Manrung *et al*, 2004).

موعد الزراعة – يعتبر التأخر في الزراعة عامل مساعد في الهروب من وصول حشرات النطاطات إلى البادرات قبل الدخول بطور التشتية (Manrung *et al*, 2004).

خدمة المحصول – من المعروف أن النباتات الضعيفة والمهملة حساسة للإصابة بنطاطات الأوراق بشكل أكبر من النباتات ذات النمو الجيد، لذلك فإن عمليات التسميد والعناية بالمحصول لها دور إيجابي زيادة المقاومة وتوفير بيئة مثالية لنمو النبات.

التداخلات الكيميائية – يمكن الإستعانة بالمبيدات الكيميائية لمجرد ظهور الإصابات بالحقل والتي يستدل على وجودها من خلال مصائد رصد النشاط الحشري، حيث أثبتت التجارب أن مكافحة نطاطات الأوراق عن طريق رش المبيدات الحشرية في حقول المراعي والمروج الطبيعية أدى إلى انخفاض نسبة الأمراض الفيروسية المنتقلة بواسطة هذه النطاطات إلى حوالي ٤٠–٦٠% (Time, 2000).

١.٩. جمع عينات النطاطات وتحضيرها للدراسة

١.٩.١ جمع عينات النطاطات

تستخدم عدة أنواع من المصائد لجمع النطاطات ومنها مصائد خاصة مزودة بشبكة من الموسلين، أو تستخدم في عملية الجمع طريقة الشفط الهوائي بواسطة مكنسة كهربائية خاصة، وهي عبارة عن مروحة تعمل بواسطة البنزين مزودة بشفاط هوائي تستخدم لامتصاص (شفط) النطاطات من المناطق النباتية الكثيفة، وتربط شبكة حشرية دقيقة الثقوب إلى نهاية فوهة المسرب من أجل أسر حشرات النطاطات (Müller, 1974). ومن الطرائق المستخدمة أيضاً رش مبيد حشري ضبابي ضمن خيمة أبعادها محددة وتوضع في مناطق مختلفة من الحقل وتعتبر هذه الطريقة فعالة ومستخدمة في كثير من دول أمريكا الجنوبية (مناطق الأمازون) (Wilson *et al*., 1987).

٢.٩.١. تحضير عينات نطاطات الأوراق من أجل الدراسة

يمكن قتل نطاطات الأوراق بواسطة مبيد حشري معياري بوضعها ضمن مطربان (إناء) يحتوي سيانيد أو أسيل أسيتات (Ethylacetate) أو يحفظ في ٧٠–٩٥% إيثانول، تثبت نطاطات الأوراق بعد تجفيفها بواسطة الدبابيس أو اللاصق. تستخدم الدبابيس فقط من أجل العينات التي أفرادها ذات حجم كبير، وتثبت هذه الدبابيس خلال الصدر الأوسط فقط في الطرف اليميني، وكذلك فإن اللاصق يوضع أيضاً على الطرف اليميني للصدر. يلصق أسفل العينة لصاقة تعريفية تتضمن مكان جمع العينة، تاريخ الجمع، اسم الجامع والنبات العائل المجموعة منه.

ولتعريف العينة على مستوى الجنس فإنه من الضروري فحص الأعضاء التناسل الذكرية، ومن أجل ذلك يعزل البطن وينقع في محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ١٠% لعدة ساعات أو يغلى في نفس المحلول لعدة دقائق من أجل إظهار الصبغة، بعد ذلك يغسل البطن بماء نظيف يحوي كمية صغيرة من حمض الخل، ثم يغسل مرة أخرى في ماء مقطر ويغمس في الغليسرين، ويحفظ في قارورة زجاجية صغيرة. كما يمكن أن تحفظ نطاطات الأوراق للتعريف في إيثانول ٨٠–٩٥ % وهذه الطريقة تسهل استخلاص أو الحمض النووي DNA أو RNA لاستخدامه في دراسة التطور الوراثي أو القرابة الوراثية بين مجموعات النطاطات (Stewart, 1981).

الفصل الثاني

٢. مواد البحث وطرائقه

١.٢. الزيارات الحقلية وجمع العينات

تم خلال الزيارات الحقلية استخدام استمارة خاصة بكل حقل تضمنت: اسم الحقل، رقم الحقل، موقع الحقل، تاريخ الجمع، النوع النجيلي المزروع مع تحديد طور النمو، أهم الأمراض والحشرات المنتشرة، أنواع الحشرات الموجودة ودرجة انتشارها، حالة المحصول، أعراض الإصابة الفيروسية الظاهرة ونسبتها. يوضح الشكل ١.٢ الاستمارة التي استخدمت في المسح الحقلي في سورية. تم تقدير نسبة الإصابة في الحقل تبعاً للأعراض الظاهرية في مجمل الحقل، وصنفت الحقول تبعاً لنسبة إصابتها إلى خمس مجموعات (أقل من ١%، ١-٥%، ٦-٢٠%، ٢١-٥٠%، أكثر من ٥٠%) مع العلم أن نسبة الإصابة حسبت بناءً على جميع الأعراض الفيروسية التي تتميز بها الفيروسات التي تصيب القمح والشعير، وذلك من تقزم، اصفرار، موزاييك، فشل في عملية التسبيل (سنابل مشوهة أو انعدام تشكل السنابل).

خلال الزيارات الحقلية، تم جمع عينات انتقائية تبدي أعراض إصابة فيروسية، مع العلم أنه تم أخذ النبات بكامله كعينة واحدة (شكل ٢.٢).

٢.٢. المسوحات الحقلية المجراة خلال فترة الدراسة

تم خلال فترة الدراسة الممتدة على الموسمين الزراعيين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و ٢٠٠٩/٢٠١٠ إجراء عدة مسوحات حقلية متوزعة في ثلاث دول هي سورية، لبنان وتركيا.

١.٢.٢. المسح الحقلي الأول في سورية (نيسان وأيار، الموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩)

شمل المسح الحقلي زيارة ٤٥ حقل قمح و٥٨ حقل شعير، موزعة في أهم مناطق زراعة القمح والشعير في سورية (المنطقة الجنوبية، المنطقة الشمالية، المنطقة الساحلية، المنطقة الشرقية) (شكل ٣.٢). جمعت خلال عملية المسح ١٩٠٩ عينة ظهرت عليها أعراضاً توحي بإصابة فيروسية

مسح حقلي على محصولي القمح والشعير في سورية من تاريخ: .... إلى........... عام ....

إتجاه المسح الحقلي من................ إلى .... رقم الحقل: ....

منطقة البداية: .... موقع الحقل: خط الطول:................. خط العرض:.............

التاريخ:......................... رقم التوقف:................. الارتفاع عن سطح البحر:....................

حالة المحصول: □ سيئة □ متوسطة □ ممتازة

طور النمو: □ بادرة □ قبل التسبيل □ تشكل السنبلة □ النضج

أعراض الإصابات الفيروسية: □ موزاييك □ اصفرار □ تقزم □ تخطط □ أعراض أخرى

تقدير النسبة المئوية لحدوث الإصابة: □ ‹ ١ □ ١– ٥ □ ٦– ٢٠ □ ٢١– ٥٠ □ › ٥٠

كثافة حشرات النطاطات: □ عالية □ متوسطة □ لايوجد

كثافة نواقل حيوية أخرى: □ عالية □ متوسطة □ لايوجد

ملاحظات أخرى:..

....

للاستخدام المخبري:

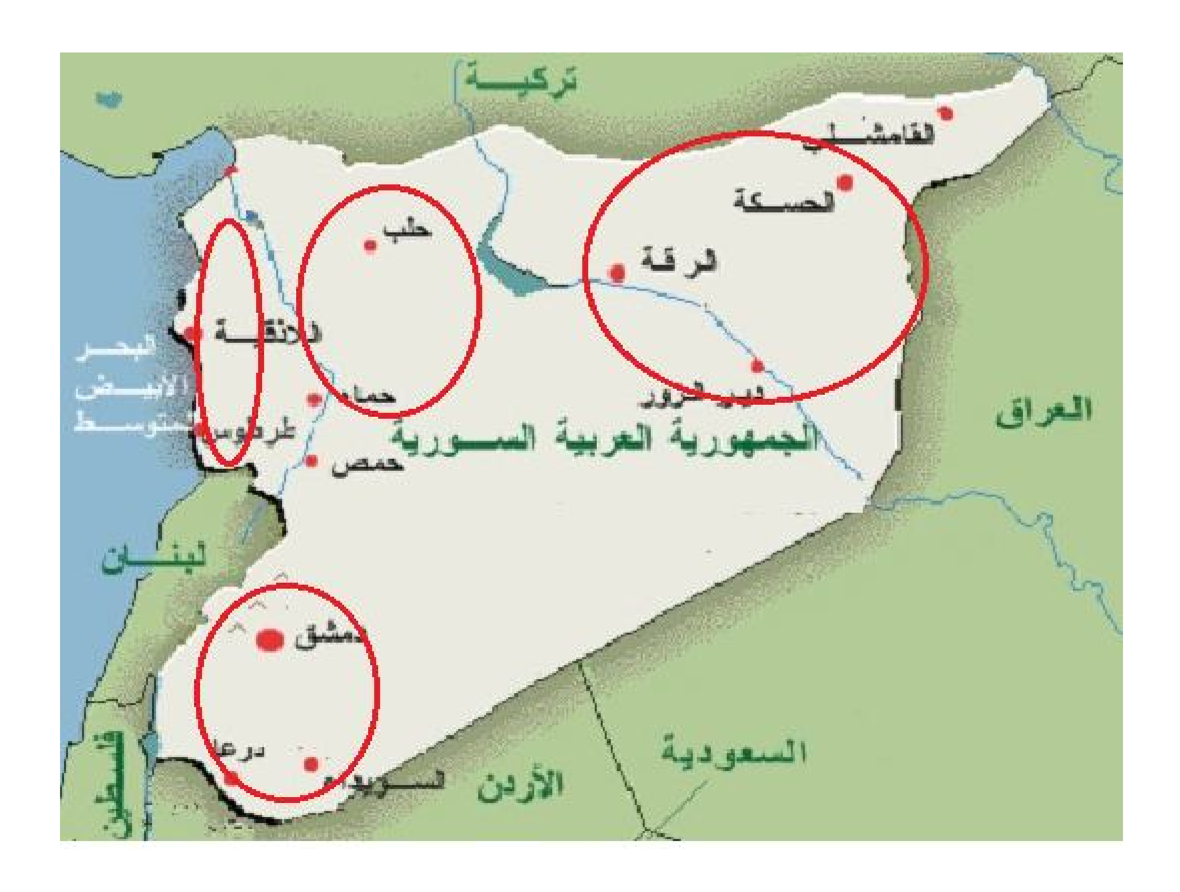
النتائج المصلية:

عدد العينات المختبرة	عدد العينات المتفاعلة إيجابياً مع المصل						عدد العينات التي كانت		
	WDV	WSMV	MSV	BSMV	BYSMV	BYDV	مصابة بفيروس واحد	مصابة بأكثر من فيروس	غير مصابة

شكل ١.٢. نموذج الإستمارة المستخدمة في المسح الحقلي والفحص المخبري.



شكل ٢.٢. طريقة جمع النباتات من الحقل بالاعتماد على الأعراض الظاهرية، وعن طريق أخذ النبات بكامل أجزائه بوصفه عينة واحدة.



شكل ٣.٢. خريطة سورية، توضح مناطق المسح الحقلي (التي تتضمنها الدوائر) للموسم الزراعي الأول (٢٠٠٨/٢٠٠٩) تبعاً للموقع الجغرافي بهدف جمع عينات القمح والشعير المصابة بالأمراض الفيروسية.

متمثلة باصفرار، او احمرار وتقزم (٩٣٨ عينة قمح و٩٧١ عينة شعير). وضعت العينات في أكياس نايلون ومن ثم أحضرت إلى مختبر الفيروسات في إيكاردا، لفحصها سيرولوجياً.

٢.٢.٢. المسح الحقلي الثاني في سورية (نيسان وأيار، الموسم الزراعي ٢٠١٠/٢٠٠٩)

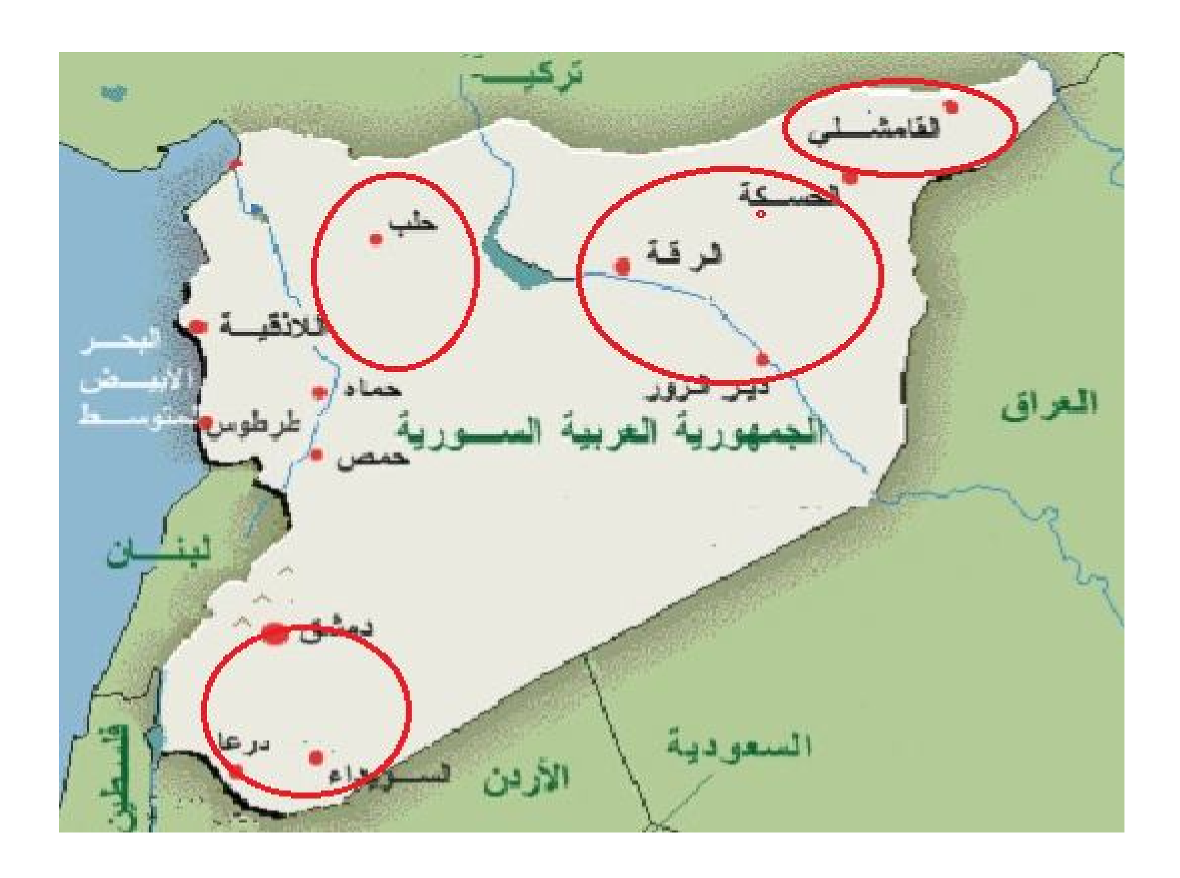
هدف المسح الحقلي الثاني في سورية إلى تأكيد النتائج التي تم التوصل إليها في المسح الحقلي الأول، مع الأخذ بعين الإعتبار الإختلاف في توقيت أخذ العينات بين المناطق الممسوحة، وبالتالي تأثيره على نسبة الانتشار الفيروسي، حيث شمل هذا المسح زيارة ٧٠ حقل قمح و٢١ حقل شعير، موزعين على نفس المناطق الممسوحة خلال عام ٢٠٠٩ ماعدا المنطقة الساحلية (شكل ٤.٢). جمعت خلال عملية المسح ١٦٥٤ عينة تظهر عليها أعراضاً توحي بإصابة فيروسية (١٢٩١ عينة قمح، ٢٨٧ عينة شعير، ٤٦ عينة شوفان و٣٠ عينة تريتيكال) وضعت العينات في أكياس نايلون ومن ثم أحضرت إلى مختبر الفيروسات في إيكاردا، لفحصها سيرولوجياً.

٣.٢.٢. المسح الحقلي في لبنان (١٣-١٧ نيسان، الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠٠٨)

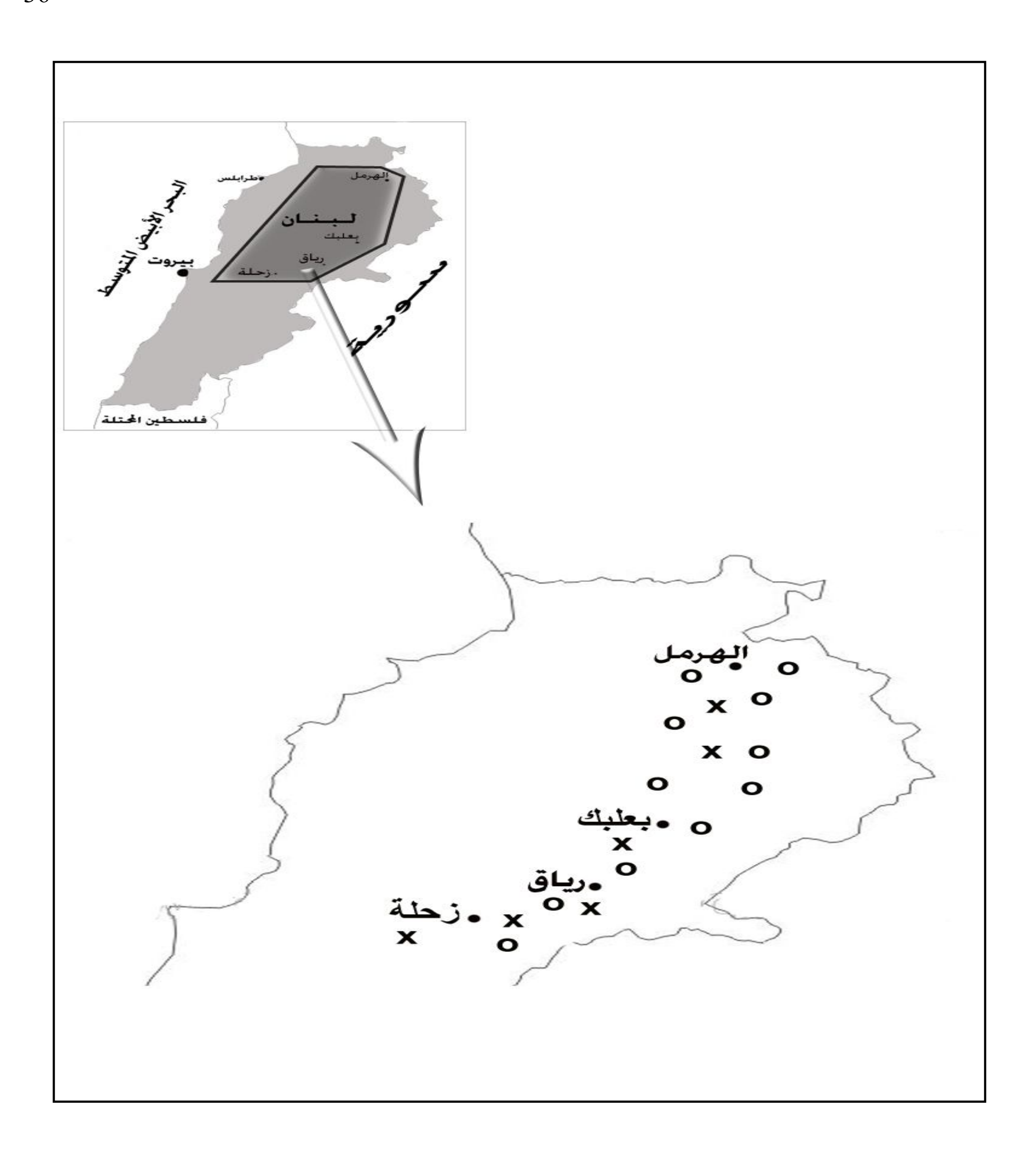
شمل المسح زيارة ١١ حقل شعير و ٦ حقول قمح موزعة في سهل البقاع (مواقع الحقول موضحه في الشكل ٥.٢). جمعت خلال عملية المسح ٢٦٤ عينة، تظهر عليها أعراضاً توحي بإصابة فيروسية (٩٠ عينة قمح و ١٧٤ عينة شعير). وضعت العينات في أكياس نايلون ومن ثم أحضرت إلى مختبر الفيروسات في إيكاردا، لفحصها سيرولوجياً.

٤.٢.٢. المسح الحقلي في تركيا (١٠-١٦ حزيران ٢٠٠٩)

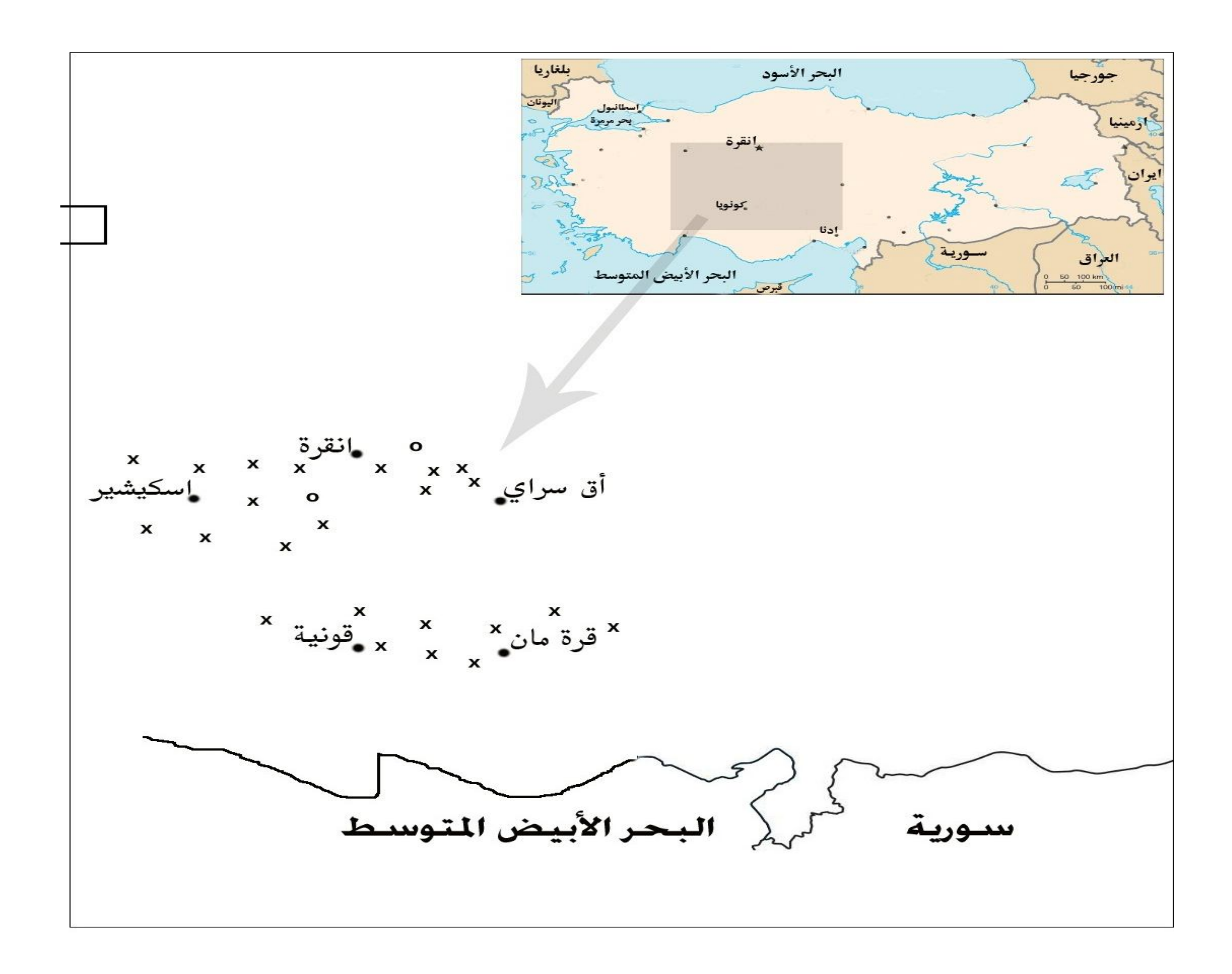
شمل المسح زيارة ٤٤ حقل قمح و ٤ حقول شعير، موزعين في منطقتين هما منطقة وسط الأناضول (أنقرة، اسكيشهر، قرة مان، أق سراي، قونية) (شكل ٦.٢)، منطقة مرمرة (بيلجيك، أدرنة، استانبول، ساكاريا، تيكيرداغ) (شكل ٧.٢). جمعت خلال عملية المسح ١٩٧٣ عينة قمح و ٢٠٠ عينة شعير تظهر عليها أعراضاً توحي بإصابة فيروسية، وضعت العينات في أكياس نايلون ومن ثم أحضرت إلى مختبر الفيروسات في إيكاردا، لفحصها سيرولوجياً.



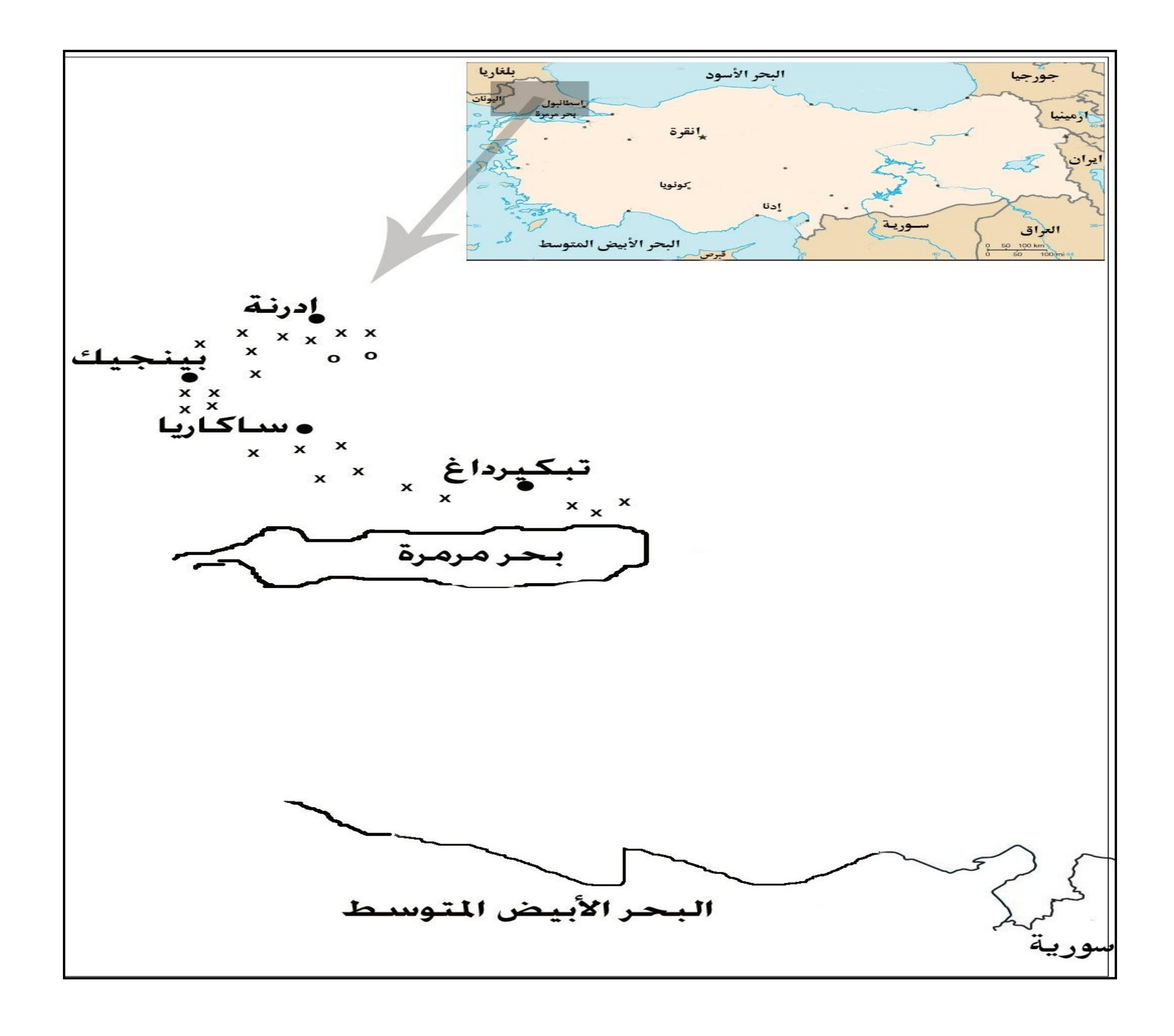
شكل ٤.٢. خريطة سورية، توضح مناطق المسح الحقلي (التي تتضمنها الدوائر) للموسم الزراعي الثاني (٢٠٠٩/٢٠١٠) تبعاً للموقع الجغرافي بهدف جمع عينات القمح والشعير المصابة بالأمراض الفيروسية.



شكل ٥.٢. مواقع حقول الشعير (○) والقمح (X) في لبنان التي جمعت منها العينات خلال الفترة مابين ١٣ –١٧ نيسان، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩



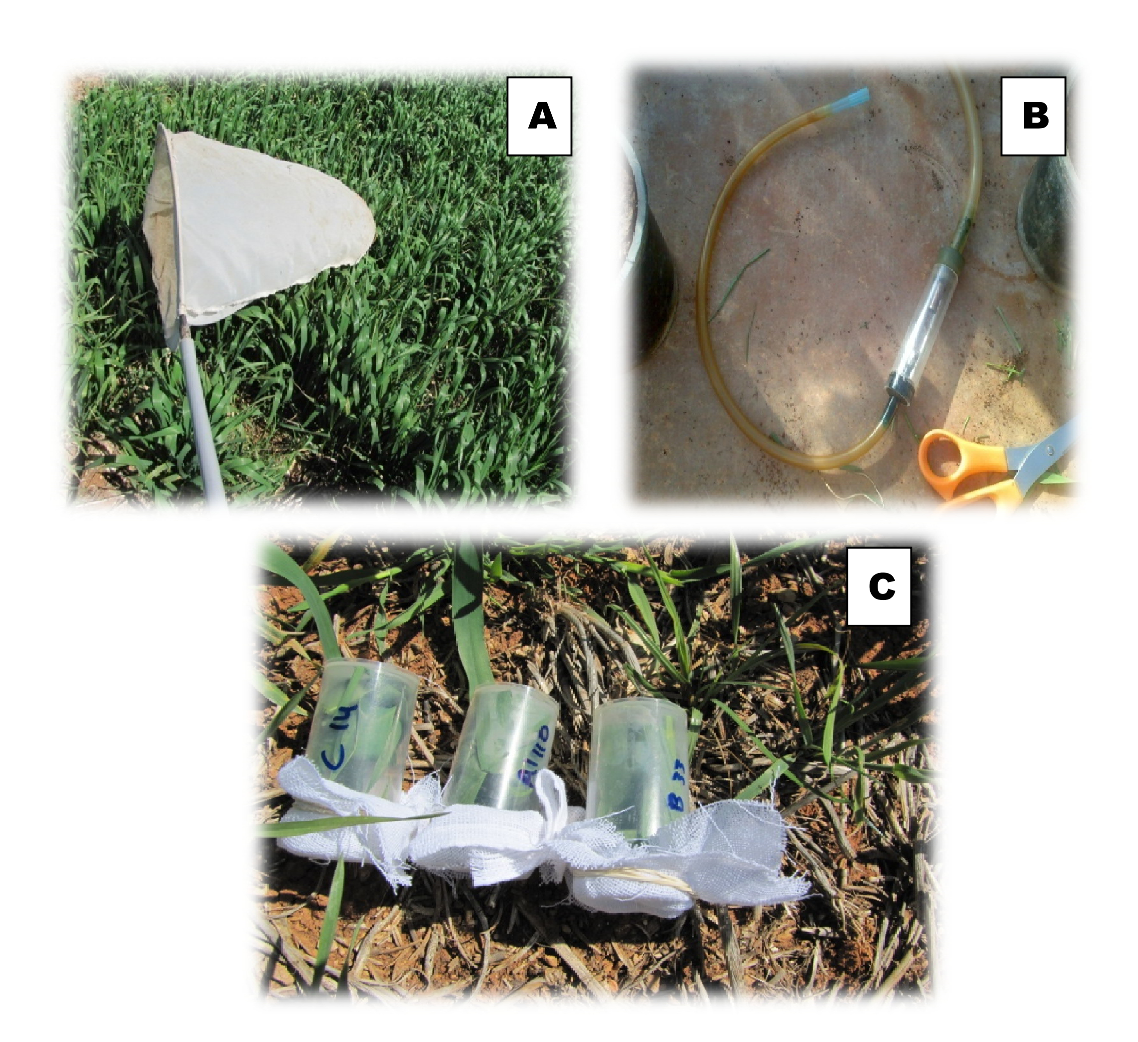
شكل ٦.٢.مواقع حقول الشعير (○) والقمح (X) في تركيا (منطقة وسط الأناضول) التي جمعت منها العينات خلال الفترة مابين١٠-١٦ حزيران، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩.



شكل ٢.٧. مواقع حقول الشعير (○) والقمح (X) في تركيا (منطقة مرمرة) التي جمعت منها العينات خلال الفترة مابين ١٠-١٦ حزيران، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩.

٣.٢. جمع حشرات نطاطات الأوراق

استخدم في عملية الجمع شبكة صيد حشري خاصة (شكل A٨.٢) مؤلفة من قضيب معدني بطول ١ م يرتبط بإحدى نهايتيه بحلقة معدنية ذات قطر ٥٠ سم يتصل بها شبكة قماشية ذات ثقوب دقيقة جداً مخروطية الشكل بارتفاع ١ م تساعد على حجز الحشرات ضمنها وذلك بعد القيام بعدة ضربات متتالية بلغ عددها ٢٠٠ وذلك بالقرب من سطح النبات في مناطق مختلفة من الحقل. أما عملية نقل النطاطات من شبكة الصيد فكان يتم باستخدام أداة خاصة محلية الصنع تدعى بالماصة (شكل ٨.٢ B)، وهي عبارة عن خرطوم مطاطي بطول ١ م يفصله حجرة بلاستيكية اسطوانية الشكل بارتفاع ١٥ سم، أحد أطراف الخرطوم المطلة على هذه الحجرة مفتوح والآخر مغلق بشبكة معدنية تساعد هذه الآلية على دخول الحشرات ولا تسمح لها بالخروج، وبالتالي حجز النطاطات داخلها، بحيث يتم إدخال أحد أطراف الخرطوم (الذي تكون نهايته المطلة على الحجرة البلاستيكية مفتوحة) ضمن شبكة الصيد، بينما يوضع الطرف الآخر على الفم وبعملية شهيق عميق يتم سحب النطاطات وحجزها ضمن الحجرة المذكورة، مع ضرورة الانتباه إلى سحب كميات قليلة من حشرات النطاطات في كل مرة من أجل سهولة التعامل معها لعدم إمكانية اصطحاب غاز CO_2 أثناء المسوحات الحقلية والذي يعتبر عامل أساسي في تخدير النطاطات أثناء التعامل معها مخبرياً، والاعتماد على عملية الزفير القوي ضمن الماصة المستخدمة لجمع حشرات النطاطات في الحقل مما يساعد على إضعاف وتثبيط حركة هذه الحشرات لثوانٍ قليلة بغية نقلها وبحركة سريعة إلى علبة بلاستيكية خاصة بقطر ٢ سم وارتفاع ١٥ سم، وضع بداخلها أوراق طازجة من نفس المحصول الذي جمعت منه الحشرات بغية تأمين الغذاء، كما أغلقت هذه العلب بقطع من الشاش لتسمح بالتبادل الهوائي وبالتالي تأمين ظروف مناسبة للنطاطات حتى الوصول للمختبر (شكل ٨.٢ C).



شكل ٢.٨. (A) شبكة الصيد المستخدمة في جمع النطاطات، (B) الماصة المستخدمة في عملية نقل النطاطات، (C) الأنابيب التي حفظت فيها النطاطات في الحقل حتى الوصول للمختبر.

٢.٤. الاختبارات المستخدمة

٢.٤.١. الاختبار المصلي/السيرولوجي المستخدم

تم الكشف عن وجود الفيروسات في العينات النباتية المختبرة باستخدام اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA) وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل مكوك وقمري (١٩٩٦) (ملحق١)، كان يعتمد على أخذ جزء من ساق إحدى إشطاءات النبات الواحد وطباعتها فردياً على أغشية النيتروسيليلوز، أما بالنسبة للنبات المؤلف من شطأ واحد فقد استخدمت إحدى أوراقه وتم طباعتها بعد لفها على بعضها لتأخذ شكل لفافة.

قدمت جميع المواد اللازمة لإجراء هذا الاختبار من مختبر الفيروسات التابع للمركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، تمت قراءة التفاعل باستعمال مكبرة ضوئية (Binocular)، واعتبر النبات مصاباً إذا تلون مقطع النبات أو تلونت الأوعية اللحائية لساق النبات المصاب باللون الأرجواني المزرق، بينما اعتبر النبات سليماً في حال عدم ظهور أي لون.

٢.٤.١.١.الأمصال المضادة المستخدمة

تم استخدام عدد من الأمصال المضادة المتخصصة التالية في المسوحات الحقلية جميعها:

١. مصل مضاد متعدد الكلون لفيروس تقزم القمح (WDV، جنس *Mastrevirus*، عائلة *Geminiviridae*) رقم AS # 0216 متحصل عليه من معهد أمراض النبات والبيولوجيا الحيوية (DSMZ).
٢. مصل مضاد متعدد الكلون لفيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV (BYDV-PAV، جنس *Luteovirus*، عائلة *Luteoviridae*)، تم انتاجه من قبل مختبر الفيروسات في إيكاردا (Makkouk & Kumari, 1993).
٣. مصل مضاد متعدد الكلون لفيروس الموازييك الشريطي للشعير (BSMV، جنس *Hordeivirus*، العائلة لم تحدد بعد)، تم انتاجه من قبل مختبر الفيروسات في إيكاردا (Makkouk & Kumari, 1993).
٤. مصل مضاد متعدد الكلون لفيروس الموازييك المخطط للقمح (WSMV، جنس *Tritimovirus*، عائلة *Potyviridae*)، رقم AS # 0226 حصل عليه من معهد أمراض النبات والبيولوجيا الحيوية بألمانيا (DSMZ).

٥. مصل مضاد متعدد الكلون لفيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط (BYSMV، جنس *Cytorhabdovirus*، عائلة *Rhabdoviridae*)، تم انتاجه من قبل مختبر الفيروسات في إيكاردا (Makkouk & Kumari, 1997).

٦. مصل مضاد متعدد الكلون لفيروس تخطط الذرة (MSV، جنس *Mastrevirus*، عائلة *Geminiviridae*)، تم انتاجه من قبل مختبر الفيروسات في إيكاردا (قمري، أبحاث غير منشورة).

٢.٤.٢. الإختبارات الجزيئية

٢.٤.٢.١. التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) Polymerase Chain Reaction

تم تنفيذ هذه الاختبارات في مختبر الأمراض الفيروسية، إيكاردا، حلب، سورية.

أ. **المادة النباتية** – استناداً إلى نتائج الاختبار المصلي/السيرولوجي (TBIA) تمَ انتقاء ستة عينات تفاعلت ايجابياً مع المصل المضاد لفيرس تقزم القمح، مثلت الأنواع النباتية المختبرة (ثلاث عينات قمح، ثلاث عينات شعير) ومناطقها الجغرافية المختلفة، لإعادة اختبارها بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) بهدف تأكيد النتائج المصلية.

ب. **استخلاص الحمض النووي (DNA) الفيروسي** – تم استخلاص الحمض النووي للعزلات المدروسة باستخدام مجموعة اختبار خاصة DNeasy® plantmini kit المنتجة في شركة Qiagen الألمانية رقم (٢٨١٠٤) وباتباع الطريقة الموصوفة من قبل Mackenzie وآخرون (١٩٩٧) (ملحق ٢).

جـ. **التفاعل المتسلسل لإنزيم البوليميراز (PCR)** – بعد استخلاص الحمض النووي DNA تم الكشف عن فيروس تقزم القمح بوساطة اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل (Oluwafemi, 2006). حيث تم استخدام زوجي البادئات WDV-F و WDV-R (جدول ٢-١) التي تقوم بتضخيم قطعة الـــ DNA بحجم ٢٥٣ زوج قاعدي من المنطقة المسؤولة عن تشفير بروتين التضاعف الفيروسي والتي تقع في إطار القراءة المفتوح الثاني (ORF2) من مجين الفيروس المدروس، ثم تحضير مزيج التفاعل بحجم نهائي ٢٥ ميكروليتر على الشكل الآتي:

ماء مقطر معقم (DH2O) .... ١٨.٨ ميكرولتر
محلول منظم (10X) .... ٢.٥ ميكرولتر
بادئة أمامية (Primer F) .... ١ ميكرولتر
بادئة خلفية (Primer R) .... ١ ميكرولتر
مزيج الإنزيمات (Taq/superscript III) .... ٠.٢ ميكرولتر
dNTPs .... ٠.٥ ميكروليتر

أخيراً تم وضع ١ ميكرولتر من الحمض النووي الكلي (المعزول من النبات المراد اختباره) تم تجميع مزيج التفاعل في قعر أنبوب التفاعل عن طريق تعريضه لعملية طرد مركزي خفيف لمدة عدة ثوانٍ عند درجة حرارة ٤ س°. تمت عملية التضخيم بخطوات منفصلة باستخدام جهاز المدوّر الحراري ABI (Appleid Biosystems Thermal cycler) من إنتاج شركة Appleid Biosystems, Fostercity (الولايات المتحدة الأمريكية) (شكل ٩.٢). حيث تم إخضاع العينات للظروف الحرارية المتغيرة حسب البرنامج الآتي:

المرحلة	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
الفصل (Denaturation)	٩٤ °س	٢ دقيقة	١
الإلتحام (Annealing)	٩٤ °س	٣٠ ثانية	٣٥
التمدد (Extension)	٤٦ °س	١ دقيقة	٣٥
التمدد النهائي (Final Extension)	٧٢ °س	٢ دقيقة	٣٥
الحفظ (storing)	٤ °س	∞	–

د. **تحضير هلام الأجاروز** – جهزت صفيحة الصب لجهاز الرحلان الكهربائي (Electrophoresis) وذلك بغسلها بالماء المقطر جيداً وتجفيفها بمحارم ورقية، ثم وضعت على جهاز تثبيت خاص مع الانتباه لضبط الصفيحة بشكل مستوٍ تماماً، ثم وضع المشط المناسب على الصفيحة وهذا يعتمد على عدد الحفر (Wells) المراد الحصول عليها في الهلام. تعتمد كمية وتركيز هلام الآجاروز المراد تحضيرها على عدد ونوع العينات المطلوب تحليلها، تم إذابة ٠.٥ غ من الأجاروز في ٥٠ مل من المحلول المنظم TBE 0.5X ذي التركيز الموضح في الملحق ٣. سخن المزيج باستخدام المايكرويف حتى الغليان

من ٢–٣ دقيقة مع تحريكه باستمرار حتى ذوبان الآجار بشكل كامل، وترك بعدها ليبرد (حوالي ٤٥°س) ثم أضيف للمزيج حوالي ٥ ميكرولتر من بروميد الإيثيديوم (Ethidium Bromide)، ليصار بعدها إلى صب المزيج بهدوء على صفيحة السكب لجهاز الرحلان الكهربائي المجهزة سابقاً بواسطة شدها من الجانبين بشريط ورقي لاصق ووضع المشط الذي يصنع حفراً في هلامة الأجاروز لتحميل عينات DNA المراد فصلها. ترك الهلام حتى يتصلب، ليسحب بعدها المشط من الهلام، وتزال الشرائط الورقية، ثم تنقل الهلامة مع الصفيحة الحاملة إلى جهاز الرحلان الكهربائي الحاوي على سائل الرحلان الكهربائي وهو نفس المحلول المنظم ٠.٥ X (TBE) المستخدم لعمل هلام الأجاروز. غمر الهلام بالمحلول المنظم بشكل جيد ووضعت حفر العينات الموجوده على الهلام باتجاه القطب السالب.

تعد إضافة بروميد الإيثيديوم في مرحلة تحضير الهلام إختيارية والهدف من إضافتها هو اختصار مرحلة صبغ الهلام بعد الترحيل الكهربائي.

هـ. **تحميل العينات المراد اختبارها على هلام الأجاروز والترحيل الكهربائي** – بعد وضع الهلام في جهاز الرحلان الكهربائي تم تحميل ٥ ميكرولتر من منتج تفاعل الـــــــ PCR لكل عينة وذلك بعد مزجها جيدا بــــــــ ٢ ميكرولتر من محلول التحميل (Loading dye Buffer) ذي التركيب الموضح في الملحق٣. حمّلت العينات بحذر تجنباً لتسرب العينات إلى الحفر المجاورة، أضيف أخيراً حوالي ٥ ميكرولتر من مؤشر لقياس الوزن الجزيئي (Molecular Weight Marker) (انتاج شركة Roche، ألمانيا، رقم 1449460) حيث يحتوي على قطع من الـــــــDNA ذات أوزان جزيئية معروفة يستدل بها على حجم العصابات (Bands) الناتجة في الهلام، ثم ركّبت الكترودات جهاز الرحلان الكهربائي حيث طبق فرق كمون قدره ٦٠ فولت في البداية حتى خروج العينات من الحفر، ثم رفع فرق الكمون إلى ١٠٠ فولت. لترفع هلامة الأغاروز بعد مرور ساعة تقريباً أو بعد أن تقطع الصبغة الزرقاء أكثر من حوالي ٧٥% من طول الهلامة.

و. **تلوين هلام الأجاروز وتظهير الهلام** – تم اللجوء لتلوين الهلام عند الإستغناء عن إضافة بروميد الإيثيديوم في مرحلة تحضير هلام الأجاروز، حيث وضع الهلام بعد عملية الترحيل الكهربائي في محلول الصبغ المكوُن من بروميد الإيثيديوم (٠.٥ ميكروليتر Ethidium bromide لكل ١ مل ماء مقطر) (ملحق ٣)، لمدة ٢٠ دقيقة في الظلام مع تحريك بسيط

على رجّاج آلي، ليرفع بعدها ويغسل بالماء العادي لإزالة الآثار الزائدة من مادة بروميد الإيثيديوم.

بهدف إظهار مضخمات الـــــــــــ DNA (العصابات) وضع الهلام فوق مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV (Ultra violet) وتم توثيق النتيجة باستخدام جهاز توثيق الهلام (Gel Documentation) وهو من النوع Alpha Innotech المزود بآلة تصوير رقمية وحاسب آلي (شكل ١٠.٢) حيث يحفظ الصورة المأخوذة وبالتالي يتم مشاهدة العصابات الناتجة وتصويرها.

٥.٢. دراسة تتالي نيوكليوتيدات المنطقة المسؤولة عن التضاعف الفيروسي في مجين الفيروس

أجريت هذه الاختبارات في مختبر الأمراض الفيروسية وبالتعاون مع مختبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، حلب، سورية.

١.٥.٢. العزلات الفيروسية

استناداً إلى نتائج الاختبار المصلي/السيرولوجي ونتائج التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) تم انتقاء العزلات الفيروسية الآتية لدراسة تتالي نيوكليوتيدات الحمض النووي الفيروسي لكل منها:

- العزلة SB 1248-09 لفيروس تقزم القمح المعزولة من نبات شعير من محافظة الحسكة (قرية السعدة)، سورية
- العزلة SW 1213-09 لفيروس تقزم القمح المعزولة من نبات قمح من محافظة الحسكة، سورية.
- العزلة TW 4227-09 لفيروس تقزم القمح المعزولة من نبات شعير من قونيا، تركيا.
- العزلة TW 4343-09 لفيروس تقزم القمح المعزولة من نبات قمح من قونيا، تركيا.
- نبات شعير تم إعدائه بالعزلة SB1248-09 باستخدام الناقل *P. provincialis* تحت ظروف البيت الزجاجي، التابع لمختبر الفيروسات في إيكاردا .
- عزلة من السويد لفيروس تقزم القمح استخدمت كشاهد ايجابي تم الحصول عليها من قبل الدكتور A.Karvnheden.

جدول ١.٢. البادئة المستخدمة في تفاعل المتسلسل لإنزيم البوليميراز (PCR) للكشف عن فيروس تقزم القمح في سورية، لبنان وتركيا (Oluwafemi, 2006).

حجم ناتج التفاعل (زوج قاعدي)	قياس البادئ (زوج قاعدي)	تتالي القواعد النتروجينية للبادئات	البادئة
253	20 20	′٥-CTTACGGAGTAGAGATGTTC-3′ ٥-′AACAGAGTGTAAGCAAGCCA-3′	WDV-F WDV-R



شكل ٩.٢. جهاز المدور الحراري ABI (Appleid Biosystems Thermal cycler) من إنتاج شركة Appleid Biosystems, Fostercity (الولايات المتحدة الأمريكية).



شكل ٢.١٠. جهاز توثيق الهلام (Gel Documentation) المزود بألة تصوير رقمية مع كاميرا خاصة وحاسب آلي يحفظ الصورة المأخوذة وهو من النوع Alpha Innotech. يستخدم الأشعة فوق البنفسجية UV لإظهار الهلام بعد عملية الرحلان الكهربائي.

٢.٥.٢. اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR)

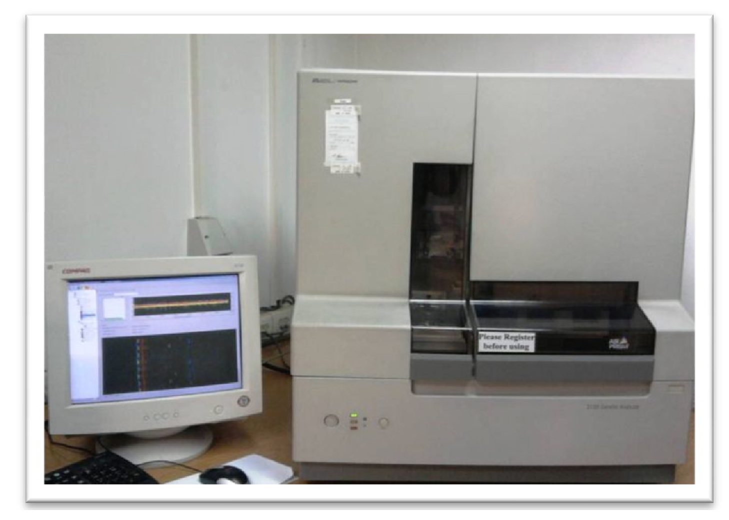
بهدف معرفة تتالي النيوكليوتيدات المنطقة المسؤلة عن التضاعف الفيروسي في مجين العزلات المذكورة فقد تم تضخيم الحمض النووي الفيروسي (DAN) بواسطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز وفقاً للمواد والطرائق المتعمدة سابقاً وبحجم تفاعل نهائي ٥٠ ميكرولتر.

٣.٥.٢. استخلاص وتنقية نواتج تفاعل الـــ PCR

تم فصل نواتج الـــPCR (لكل عزلة على حدة) من هلامة الأجاروز ١.٥%، ثم تم تنقيتها باستخدام مجموعة استخلاص خاصة (QIA quik Gel Extraction Kit) من إنتاج شركة Qiagen (رقم ٢٨٧٠٤) وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (ملحق ٦).

٤.٥.٢. تحديد تتالي نيكليوتيدات المنطقة المسؤولة عن التضاعف الفيروسي في مجين الفيروس

أخذت نواتج التضخيم بعد تنقيتها في الفقرة السابقة بغية تحديد تتالي نيكليوتيدات الحمض النووي الفيروسي وأدخلت في تفاعل للبوليميراز مرة ثانية لكن باستخدام كل بادئة (اليمنى واليسرى) على حدى، ثم أرسلت إلى مختبر التقانات الحيوية في إيكاردا حيث تم سلسلتها بواسطة جهاز ٣١٠٠ ABI (Appleid Biosystems Genetic analysir) من إنتاج شركة Appleid Biosystems, Fostercity (الولايات المتحدة الأمريكية). وذلك باستخدام مجموعة تحليل خاصة ABI PRISM BigDye Terminators version 3.1 Cycle sequencing Kit من إنتاج شركة Applied Biosystems, Foster city, CA (الولايات المتحدة الأمريكية) (شكل ١١.٢). تمت معالجة البيانات المتحصل عليها باستخدام برنامج (DNAMAN Lynnon Biosoft ,Canada version 4.0) وبالتالي تم الحصول على التسلسل النيكليوتيدي لقطعة من المنطقة التي تشفر بروتين التضاعف الفيروسي. في منطق القراءة المفتوحة الثانية ORF2. تمت مقارنة التسلسل المتحصل عليه للعزلات المذكورة مع عدة تسلسلات لعزلات فيروسية أخرى حول العالم (جدول ٢.٢) موجودة في قاعدة البيانات التابعة للبنك الوراثي NCBI باستخدام برنامج البحث عن الاصطفافات في قاعدة البيانات BLAST. تم إنشاء شجرة القرابة الوراثية (Homology tree) لتلك العزلات باستخدام برنامج (DNAMAN Lynnon Biosoft , Canada version 4.0).



شكل ٢.١١. جهاز Applied Biosystems ABI 3100 Genetic analyzer الذي استخدم لتحديد التتالي النكليوتيدي لقطعة من المجين تتضمن منطقة القراءة المفتوحة الثانية ORF2 والتي تشفر بروتين التضاعف لفيروس تقزم القمح.

جدول ٢.٢. العزلات العالمية المستخدمة في المقارنة مع العزلات السورية المدروسة من فيروس تقزم القمح (*Wheat dwarf virus*).

المصدر الجغرافي	**رقم العزلة في بنك المورثات**	**الإسم المختصر للعزلة**
إيران	FJ620684	BDV-Iran
ألمانيا	AM942044	BDV-SxA57
ألمانيا	AM942045	BDV-SxA36
هنغاريا	FM999832	WDV-D01
تشيك	FJ546191	WDV-CZ1841
ألمانيا	AM296023	WDV-SxA23
هنغاريا	FN806786	WDV-HU-Pula
فرنسا	X82104	WDV-V1, V2, C1, CX
أوكرانيا	FN806784	WDV-UK-Miron
السويد	AJ311031	WDV-Enkoping1
الصين	EF536868	WDV-Hebeishjaz-HBSJZ069

٦.٢. تقدير الكفاءة الحيوية لبعض أنواع حشرات النطاطات في نقل فيروس تقزم القمح

١.٦.٢. أنواع حشرات النطاطات المستخدمة

استخدم في هذا البحث أربعة أنواع من حشرات النطاطات جمعت خلال المسوحات الحقلية من حقول القمح والشعير في سورية، تم التفريق بينها مخبرياً على أساس مورفولوجي (اللون، شكل الجسم، شكل الرأس، قرون الإستشعار، النهاية البطنية، طول الأجنحة بالنسبة للجسم)، وبالتعاون مع المختصين في إيكاردا، وتوفيراً للجهد والمال فلم نعمد إلى تصنيف هذه الأنواع الأربعة بانتظار نتائج اختبار كفاءتها الحيوية في نقل فيروس تقزم القمح.

٢.٦.٢. تربية وإكثار حشرات النطاطات

تم الإعتماد على غاز CO_2 (شكل ١٢.٢)، في تخدير ونقل حشرات النطاطات إلى نباتات قمح وشعير سليمة بطور البادرة مزروعة في أصص قطرها ٢٥ سم، بحيث يحوي كل أصيص على حوالي ١٠–١٥ بادرة، وضع عليها حوالي ١٥–٢٠ حشرة نطاط من كل نوع على حدى. حجزت النباتات بأقفاص بلاستيكية أسطوانية الشكل مصنوعة من مادة البولي فينيل كلورايد (PVC) قطرها ٢٠ سم، ومزوده بفتحات جانبية وفتحات علوية مغطاة بنسيج شبكي يسمح للتهوية، وضعت هذه الأصص (المغطاة بأقفاص بلاستيكية والمحتوية على الحشرات) في بيت زجاجي عند درجة حرارة ١٨–٢٠°س، ورطوبة ٧٠–٨٠% وإضاءة ١٦ L / 8 D (شكل ١٣.٢).

٣.٦.٢. العزلة الفيروسية المستخدمة

استخدمت العزلتين SB 1248-09 و SW 2131-09 لفيروس تقزم القمح التي جرى الحصول عليهما من نبات شعير وقمح، وعلى التوالي، جمعتا من محافظة الحسكة في الموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩، وتم تحديدهما بواسطة الاختبارات المصلية والجزيئية الموضحة سابقاً.

٢.٦.٤. تقدير كفاءة بعض أنواع حشرات النطاطات في نقل الفيروس

نفذت هذه التجربة تحت ظروف البيت الزجاجي، حيث تم تغذية أنواع حشرات النطاطات المدروسة (كل نوع على حدى) على نباتي الشعير والقمح المصابان بالعزلتين الفيروستين لاكتساب الفيروس خلال مدة حوالي ٤٨ ساعة، حيث وضع كل نبات ضمن أصيص يحتوي على خلطة تراب: رمل: بيتموس بنسبة ١:١:١ في محاولة لإعادة زراعته مع التأكد بعدم إصابة المجموع الجذري بأية أضرار جراء عملية الجمع والنقل واحتفاظه بجزء من التربة حوله، كما وضع الشطء الذي تم طباعته من كل نبات (حيث كان محافظاً على حيويته نتيجة حفظه عند درجة حرارة ٤°س، وكما هو الحال بالنسبة للنبات الأصل). حجزت النباتات بأقفاص بلاستيكية أسطوانية الشكل مصنوعة من مادة البولي فينيل كلورايد (PVC) قطرها ٢٠ سم، ومزوده بفتحات جانبية وفتحات علوية مغطاة بنسيج شبكي يسمح للتهوية، ترفع هذه الأقفاص بعد نقل حشرات النطاطات الحاملة للفيروس (افتراضياً) لتتغذى على بادرات قمح وشعير مدة ٤٨ ساعة. يعاد حجز النباتين المذكورين بعد وضع النوع الأخر من النطاطات ليحصل على تغذية الإكتساب المفروضة لكن بعد عملية التأكد من عدم وجود أية حشرة من النوع السابق، وذلك بترك النبات بدون تغطية لمدة ساعتين ضمن ظروف البيت الزجاجي الذي يحوي بادرات قمح وشعير سليمة بحيث لوحظ وجود تفضيل غذائي للبادرات الفتية من قبل حشرات النطاطات بأنواعها المختلفة. تم عزل النباتات المعداة ضمن أقفاص بلاستيكية مانعة لدخول الحشرات تحت ظروف البيت الزجاجي، رشت بعد ذلك بالمبيد الحشري شركونيل (ميثوميل)، وتم التأكد من الإصابة بعد أربعة أسابيع من نقل العدوى بواسطة اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي TBIA وباستخدام المصل المضاد متعدد الكلون لفيروس تقزم القمح. احتسبت كفاءة النقل كنسبة مئوية بعدد النباتات المصابة في إجمالي النباتات المعداة في كل نوع نباتي، تم تكرار التجربة ثلاث مرات متوالية بهدف تأكيد النتائج.

٢.٦.٥. المحافظة على العزلة الفيروسية

بعد معرفة نتائج اختبار تقدير كفاءة أنواع حشرات النطاطات في نقل العزلتين المذكورتين تم المحافظة على العزلة SB 1248-09 وذلك عن طريق إكثارها على نباتات شعير (صنف محلي) بواسطة النقل الحشري المستمر (باستخدام نطاط الأوراق P. provincialis) للفيروس إلى بادرات شعير جديدة تحت ظروف البيت الزجاجي وفقاً لما ذكر أعلاه.



شكل ١٢.٢. طريقة أخذ غاز CO_2 المستخدم في تخدير النطاطات لتثبيت حركتها



شكل ١٣.٢. الأقفاص الإسطوانية البلاستيكية المستعملة في تربية حشرات النطاطات تحت ظروف الدفيئة الزجاجية.

٢.٧. تحديد المدى العوائلي لفيروس تقزم القمح

٢.٧.١. مصدر العزلة الفيروسية وحشرات النطاطات المستخدمة في العدوى

بناءً على نتائج الاختبار المصلي واختبار تقدير الكفاءة الحيوية لبعض حشرات النطاطات في نقل فيروس تقزم القمح، تم اختيار العزلة SB 1248-09 المعزولة من نبات شعير في محافظة الحسكة لدراسة المدى العوائلي لها، تم اختيار النوع *Psammotettix provincialis* (Ribaut) في عملية النقل الحشري لهذه العزلة، حيث تم إكثار هذه الحشرات تحت ظروف البيت الزجاجي على أحواض من الشعير مغطاة بأقفاص بلاستيكية خاصة محكمة الإغلاق مزودة بفتحات جانبية وعلوية مغطاة بنسيج شبكي للتهوية.

٢.٧.٢. الأنواع النجيلية المختبرة وإجراء الإعداء بالفيروس

استخدم في هذه الدراسة سبعة أنوع نباتية تتبع العائلة النجيلية (جدول ٣.٢)، تم الحصول على بذورها من بنك الأصول الوراثية في إيكاردا بحيث تمثل تنوع جغرافي جيد وذلك من خلال التنوع في مصادر البذور للأنواع المختبرة. تم إنبات البذور في أصص بلاستيكية تحوي خلطة مكونة من تراب: رمل: بتموس بنسبة ١:١:١، وذلك بمعدل ثلاثة أصص لكل نوع من الأنواع المستخدمة في التجربة وبواقع خمس بادرات في كل أصيص. أعدي أصيصان وترك أصيص من دون عدوى بوصفه شاهداً. تم إجراء العدوى على الأنواع النجيلية المستخدمة عند مرحلة ظهور الورقة الثانية، باستخدام حشرات نطاطات الأوراق من النوع *P. provienalis* بعد تغذيتها على مصدر مصاب لمدة يومين، وبمعدل ٣–٤ حشرات للنبات الواحد، تم تغطية نباتات الأصيص الواحد بقفص بلاستيكي مزود بفتحات شبكية للتهوية وضمان بقاء حشرات النطاطات على النباتات وعدم هروبها (أجريت العدوى ضمن حرارة البيت الزجاجي ٢٢°س)، رشت النباتات بعد يومين من العدوى بمبيد ميثوميل (تركيز ٠.٥ غ/لتر) للقضاء على حشرات النطاطات. فحصت النباتات باختبار بصمة النسيج النباتي (TBIA) بعد شهر تقريباً من العدوى لمعرفة إن كانت النباتات مصابة بالفيروس أم لا.

جدول ٣.٢. الأنواع النباتية التابعة للعائلة النجيلية (*Poaceae*) المستخدمة في دراسة المدى العوائلي لفيروس تقزم القمح.

الإسم العربي	**الإسم العلمي**	**المصدر**
الشوفان	*Avena sativa*	العراق (نينوى)
الشوفان	*Avena sativa*	أوزبكستان
الشوفان	*Avena sativa*	أزربيجان (Masalli)
الشوفان	*Avena sativa*	طجكستان (Sughd)
بوشرنته	*Bromus rigidus*	المغرب (Eastern (Oriental)
بوشرنته	*Bromus rigidus*	المغرب (Center North)
بوشرنته	*Bromus rigidus*	المغرب (Eastern (Oriental)
بوشرنته	*Bromus rigidus*	المغرب (Eastern (Oriental)
قدم الديك	*Dactylis glomerata*	كازاخستان (Alma-Ata)
قدم الديك	*Dactylis glomerata*	كازاخستان (Bishkek)
قدم الديك	*Dactylis glomerata*	كازاخستان (Issyk-kul)
قدم الديك	*Dactylis glomerata*	كازاخستان (Issyk-kul)
الفستوكة (شربير)	*Festuca elatior*	المغرب (Eastern (Oriental)
الشعير	*Hordeum vulgare subsp. Vulgare convar. Disticho*	سوريا (الحسكة)
الشعير	*Hordeum vulgare subsp. Vulgare convar. Disticho*	سوريا (حلب)
الشعير	*Hordeum vulgare subsp. Vulgare convar. Disticho*	سوريا (درعا)
الشعير	*Hordeum vulgare subsp. Vulgare convar. Disticho*	سوريا (دمشق)
الشعير	*Hordeum vulgare subsp. Vulgare convar. Disticho*	سوريا (حماة)
القمح الطري	*Triticum aestivum subsp.aestivum*	سوريا (حمص)
القمح الطري	*Triticum aestivum subsp.aestivum*	سوريا (اللاذقية)
القمح الطري	*Triticum aestivum subsp.aestivum*	سوريا (طرطوس)
القمح الطري	*Triticum aestivum subsp.aestivum*	سوريا (حماة)
القمح القاسي	*Triticum turgidum subsp.durum*	سوريا (الحسكة)
القمح القاسي	*Triticum turgidum subsp.durum*	سوريا (إدلب)
القمح القاسي	*Triticum turgidum subsp.durum*	سوريا (اللاذقية)
القمح القاسي	*Triticum turgidum subsp.durum*	سوريا (حمص)

٢.٨. عزل وتنقية فيروس تقزم القمح

٢.٨.١. العزلة الفيروسية المستخدمة وطريقة إكثارها

استخدمت العزلة السورية SB1248-09 والمعزولة من نباتات شعير خلال المسح الحقلي الذي نفذ في هذه الدراسة، والتي تم تعريفها مصلياً على أنها فيروس تقزم القمح، وتم تأكيد النتائج بالاختبارات الجزيئية. نقلت هذه العزلة في البداية من نبات شعير حامل لها إلى نبات شعير سليم (صنف محلي) وذلك باستخدام الناقل الحيوي *P. provincialis* عن طريق وضع (٥–١٠) حشرة من حشرات نطاطات الأوراق التابعة لهذا النوع ومن أطوار مختلفة خالية من أي إصابة فيروسية على نبات الشعير المصاب بالعزلة المدروسة مدة ٤٨ ساعة لاكتساب الفيروس. نقلت الحشرات (المغذاة على النبات المصاب) إلى بادرات شعير سليمة للقيام بعملية تغذية الإلقاح ولمدة ٤٨ ساعة، ليتم بعدها التخلص من حشرات النطاطات باستخدام مبيد حشري ذو تأثير جهازي وفترة بقاء قصيرة في النبات مثل المبيد شركونيل (ميثوميل) بمعدل ١ غ/١ لتر مادة فعالة. فحصت النباتات المعداة بعد ٢١ يوم من الإعداء باختبار بصمة النسيج النباتي المناعي وباستخدام المصل المضاد متعدد الكلون المتخصص بالكشف عن فيروس تقزم القمح، حيث تم التأكد من انتقال العزلة إلى نباتات الشعير المعداة. تمت جميع مراحل النقل ومضاعفة العزلة المدروسة على نباتات شعير وبنفس الطريقة السابقة ضمن ظروف البيت الزجاجي عند درجة حرارة ٢٠–٢٥°س، ورطوبة نسبية ٧٠–٨٥%، للحصول على أكبر كمية من النسيج النباتي المصاب بالعزلة الفيروسية المدروسة.

٢.٨.٢. حفظ النسيج المصاب

تعد عملية حفظ الأنسجة المصابة عملية هامة ومؤثرة على جودة عملية الإستخلاص للجسيمات الفيروسية، حيث تم تقطيع الأنسجة المصابة إلى قطع صغيرة ثم عوملت بالآزوت السائل (N2) وطحنت مباشرة باستخدام خلاط كهربائي للحصول على مسحوق دقيق من هذه الأنسجة (شكل ٢.١٤)، وضع المسحوق في وعاء زجاجي محكم الإغلاق وحفظ هذا الوعاء في المجمدة عند درجة –٢٠°س وذلك لحين الحصول على كمية من الأنسجة المصابة كافية لعملية الاستخلاص.

٣.٨.٢. استخلاص وتنقية الفيروس

تم استخلاص الفيروس من النباتات المصابة بالعزلة السورية SB1248-09 كما استخدمت نباتات سليمة للمقارنة وذلك حسب الطريقة الموصوفة من قبل Lindsten وآخرون (١٩٨٠) مع إجراء بعض التعديلات (ملحق ٤)، ثم جمع الفيروس النقي وأخذت قيم امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية باستخدام المطياف الضوئي عند أطوال الموجتين ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتراً ثم حسبت كمية الفيروس النقي المتحصل عليها بتطبيق القانون التالي :

كمية الفيروس $= \frac{\text{O.D X vol}}{\text{Ext.coeff}}$

حيث أن :

- optical density (O.D) = الكثافة البصرية وتعبر عن درجة امتصاص الفيروس النقي للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة ٢٦٠ نانومتراً.
- Volum (vol) = حجم المستخلص الفيروسي النقي بالميليليتر والمتحصل عليه من ١ كغ نسيج نباتي مصاب.
- Extinction coefficient (Ext.coeff) = معامل التمييز وهو رقم خاص ثابت لكل فيروس ويمثل امتصاص محلول من الفيروس النقي ذي التركيز ١ مغ/١ مل للأشعة فوق البنفسجية عند موجة طولها ٢٦٠ نانومتراً، ويساوي ٧.٧ بالنسبة لفيروس تقزم القمح.

٤.٨.٢. انتاج المصل المضاد متعدد الكلون لفيروس تقزم القمح وتقدير فعاليته

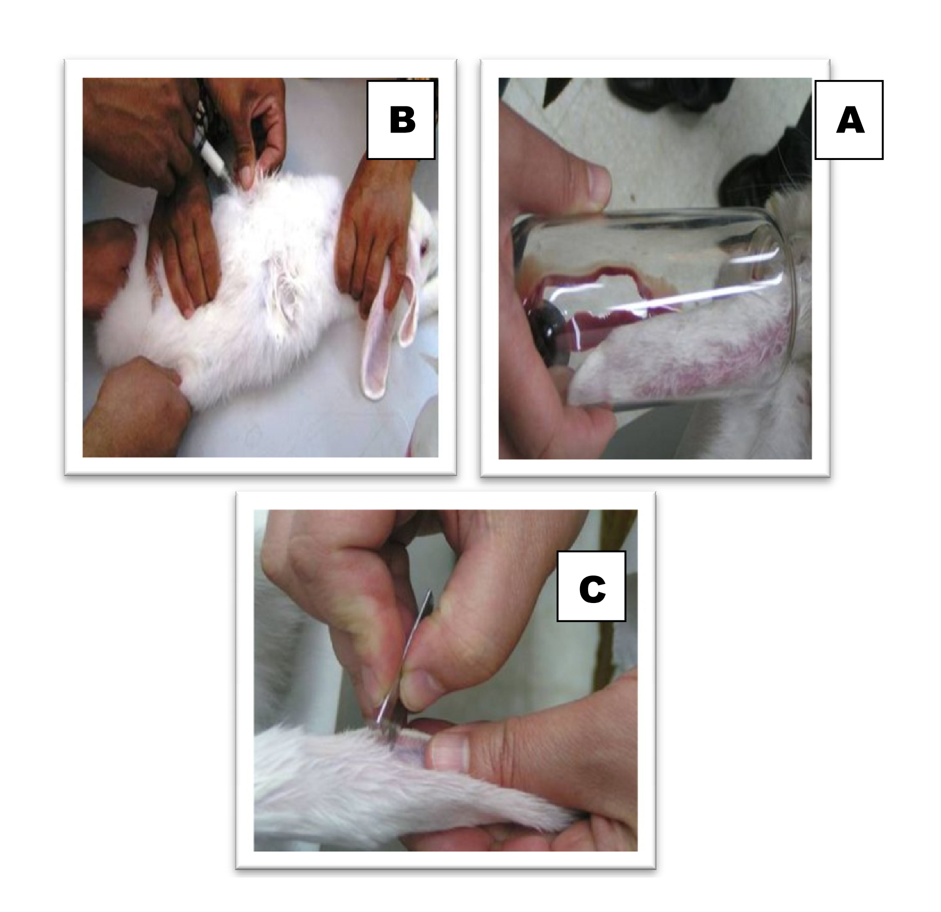
قسمت كمية المستخلص الفيروسي النقي للعزلة SB 1248-09 من فيروس تقزم القمح إلى خمس حقن، وتمت عملية إنتاج المصل المضاد بحقن أرنب أبيض نيوزيلندي ذكر ٤ حقنات حيث احتوت كل حقنة على كمية من الفيروس المنقى ممزوج بشكل جيد مع مادة حاملة تشكل مستحلب زيتي. حضرت الحقنة الأولى بمزج ١ مل من المحضر الفيروسي النقي بحجم مماثل من مادة حاملة تشكل مستحلب زيتي كامل (Fieund's complete adguvant)، وحقنت في جسم الأرنب تحت الجلد (Sub-cataneous) في أربع مواضع (شكل A١٥.٢). ثم بعد أسبوع حقن الأرنب حقنة ثانية في وريد الفخذ، حيث حضرت الحقنة بمزج ١ مل فيروس نقي من المحضر الفيروسي بحجم مماثل من مادة حاملة تشكل مستحلب زيتي غير كامل (Fieund's incomplete adguvant) أما بقية الحقنات فقد حضرت باستخدام المادة الحاملة التي تشكل مستحلب زيتي غير كامل وحقنت بفاصل أسبوع بين الحقنة والأخرى، تم حقن الأرنب حقنة داعمة بعد ثلاثة أسابيع من الحقنة

الرابعة. سحب الدم من أذن الأرنب بعد أسبوع من الحقنة الرابعة حيث جرح الوريد الموجود في الأذن باستخدام شفرة معقمة (شكل ١٥.٢B)، ثم استنزف الدم بواسطة مضخة تفريغ هواء (شكل ١٥.٢C)، تم تكرار عملية سحب الدم أسبوعياً ولـــ ٨ مرات بمعدل ٢٠–٣٠ مل دم كل مرة، وضع الدم المسحوب عند درجة حرارة ٤°س، ولمدة ١٦ ساعة (ليلة كاملة) حتى يتخثر، بعد ذلك تم فصل الخثرة وأخضع المصل لطرد مركزي بسرعة ٥٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٠ دقيقة باستخدام جهاز الطرد المركزي Eppendorf 5415 R عند درجة حرارة ٤°س. تم جمع السائل الطافي الحاوي على الأجسام المضادة، أضيف للمصل أزيد الصوديوم (Sodium Azide) بنسبة ٠.٠٢% وذلك لمنع نمو الجراثيم، حفظ المصل المضاد عند درجة حرارة –٢٠°س لحين الاستخدام.

ولدراسة كفاءة المصل المضاد المتحصل عليه تم استخدام اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي، حيث تم تحضير تخفيفات مختلفة من المصل المضاد تدرجت من ١:١٠٠٠ حتى ١: ٢٥٦٠٠٠ لسحوبات الدم الثمانية. استعمل في الإختبار نبات شعير مصاب بالعزلة المدروسة ونبات سليم للمقارنة. تمت عمليات التخفيف بخلط الأجسام المضادة بمستخلص نبات شعير سليم وبتركيز ١:٢٠ (١ غ نبات شعير سليم لكل ٢٠ مل من محلول منظم فوسفاتي ملحي) وذلك لتقليل التفاعلات غير المتخصصة، ومن ثم حضنت التخفيفات المحضرة عند درجة حرارة ٤°س لمدة ١٦ ساعة (ليلة كاملة) أو يمكن تحضينها عند درجة حرارة ٣٧ °س لمدة ساعتين، وذلك للتخلص من الأجسام المضادة غير المتخصصة إن وجدت. بالنسبة لمحلول الأجسام المضادة متعددة الكلون المنتجة في جسم الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب والمرتبطة بإنزيم الفوسفات القلوي Alkaline phosphatase (Whole molecule -Goat-anti rabbit IgG) فقد استخدمت بتخفيف ١:٣٠٠٠ حيث تم التخفيف في محلول الربط.



شكل ٢.١٤. عملية طحن الأنسجة النباتية المصابة بفيروس تقزم القمح باستخدام الآزوت السائل ضمن الخلاط الكهربائي.



شكل ٢.١٥. (A) حقن الأرنب بالمحضر الفيروسي النقي للعزلة السورية SB1248-09 من فيروس تقزم القمح، (B) إحداث جرح في الوريد الأذني للأرنب المحقون بهدف استنزاف الدم، (C) استنزاف الدم من الأرنب المحقون بواسطة مضخة التفريغ.

الفصل الثالث

٣. النتائج

١.٣. نتائج المسوحات الحقلية والاختبارات المصلية

١.١.٣. المسح الحقلي الأول في سورية (نيسان وأيار، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩)

بينت الملاحظات الحقلية أن الأعراض الظاهرية المميزة في حقول القمح والشعير الممسوحة تمثلت بتقزم النباتات مع اصفرار أو احمرار للأوراق (شكل ١.٣)، كما شوهد أعراض تخططات وموزاييك على أوراق القمح والشعير بدرجة أقل، وكان جلياً وجود نقص في الغلة مرتبط مع شدة الأعراض الملاحظة. حيث تراوحت نسبة الإصابة التقديرية وفقاً للمشاهدات الحقلية ما بين ١-٤٠%، إلا أنها تجاوزت ٦٠% في بعض حقول المنطقة الشرقية.

دلت نتائج الاختبار المصلي (TBIA)، على سيادة فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV (BYDV-PAV)، حيث أمكن الكشف عنه في ٢٠% من العينات المختبرة، فيما احتل فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط (BYSMV) المرتبة الثانية بنسبة ١.٢%، وجاء فيروس تقزم القمح (WDV) في المرتبة الثالثة بنسبة ١.١%، بينما كُشف عن فيروس الموزاييك الشريطي للشعير (BSMV) وفيروس الموزاييك المخطط للقمح (WSMV) في ٠.٦ و ٠.٥% من العينات المختبرة، على التوالي، ولم يتم الكشف عن أية إصابة بفيروس تخطط الذرة (MSV). أمكن الكشف عن الإصابة المختلطة بأكثر من فيروس في ٠.٨% من العينات المختبرة (جدول١.٣). تركزت الإصابة بفيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط (BYSMV) و فيروس الموزاييك الشريطي للشعير (BSMV) في حقول الشعير، دون تسجيل أية إصابة في حقول القمح. أما بالنسبة للإصابة بفيروس الموزاييك المخطط للقمح (WSMV) فقد سجلت في حقول القمح فقط. أبدى محصول الشعير حساسية أكبر للإصابة بالفيروسات المختبرة، حيث بلغت نسبة الإصابة في عينات الشعير المجموعة ٢٤.٨% بينما انخفضت نسبة الإصابة حتى ١٩.٣% في عينات القمح، وبمعدل ٢٢.١% في جميع العينات المجموعة.

أشارت نتائج المسح الحقلي إلى وجود فيروس تقزم القمح (WDV) في حقول القمح والشعير في محافظة الحسكة (قرية السعدة) بنسبة إصابة بلغت ١٦.٣% من مجموع العينات المأخوذة من تلك المنطقة (حيث كانت نسبة الإصابة بهذا الفيروس في عينات الشعير ٣٣% و١٤% في عينات القمح)،



شكل ٣.١. الأعراض الملاحظة خلال المسح الحقلي ٢٠٠٨/٢٠٠٩ على نباتات شعير في قرية السعدة بمحافظة الحسكة.

جدول ١.٣. نتائج تفاعل عينات القمح والشعير المجموعة من سورية (نيسان وأيار، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩) مع الأمصال المضادة باستخدام إختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA).

المحصول/ المحافظة	عددالحقول الممسوحة	عدد العينات المختبرة	عدد العيّنات التي تفاعلت إيجابياً مع الأمصال*					عدد العينات المصابة بفيروس واحد	عدد العينات المصابة بأكثر من فيروس	عدد العينات السليمة
			BYDV-PAV	BYSMV	BSMV	WSMV	WDV			
محصول القمح										
اللاذقية	١٣	١٧٣	٤٢	٠	٠	١	٠	٤٣	٠	١٣٠
طرطوس	٤	٦٣	١٨	٠	٠	٠	٠	١٨	٠	٤٥
حلب	٤	٧٣	٥	٠	٠	٠	٠	٥	٠	٦٨
إدلب	٥	١١٤	٦	٠	٠	١	٠	٧	٠	١٠٧
درعا	٣	٤١	٦	٠	٠	٣	٠	٩	٠	٣٢
السويداء	٣	٤٨	٤	٠	٠	٠	٠	٤	٠	٤٤
الرقة	٤	١٣٤	٢٦	٠	٠	٢	٠	٢٦	١	١٠٨
دير الزور	٣	١٠٠	١٩	٠	٠	٠	٠	١٩	٠	٨١
الحسكة	٦	١٩٢	٣٣	٠	٠	٣	١٦	٥٠	٢	١٤٢
مجموع القمح	**٤٥**	**٩٣٨**	**١٥٩**	**٠**	**٠**	**١٠**	**١٦**	**١٨١**	**٣**	**٧٥٧**
% لإصابة القمح			**١٦.٩**	**٠**	**٠**	**١.١**	**١.٧**	**١٩.٣**	**٠.٣**	**٨٠.٧**
محصول الشعير										
اللاذقية	٦	١٠٠	٦٥	٠	٢	٠	٠	٦٣	٢	٣٧
طرطوس	٢	٣٤	٢٢	٠	٠	٠	٠	٢٢	٠	١٢
حلب	٥	٧٦	٨	٠	٣	٠	٠	٧	٢	٦٩
إدلب	٥	١٠٣	١٢	٠	٠	٠	٠	١٢	٠	٩١
درعا	٨	١٩٥	١٩	١٦	٥	٠	٠	٣٠	٦	١٦٥
السويداء	٧	١٢٧	١٢	٥	٠	٠	٠	١٣	٢	١١٤
الرقة	١٠	١٤٠	٢٨	٠	٠	٠	٠	٢٨	٠	١١٢
دير الزور	٧	٩٨	٢٠	٠	٠	٠	٠	٢٠	٠	٧٨
الحسكة	٨	٩٨	٣٧	٢	٢	٠	٥	٤٦	٠	٦١
مجموع الشعير	**٥٨**	**٩٧١**	**٢٢٣**	**٢٣**	**١٢**	**٠**	**٥**	**٢٤١**	**١٢**	**٧٣٩**
% لإصابة الشعير			**٢٣**	**٢.٤**	**١.٢**	**٠**	**٠.٥**	**٢٤.٨**	**١.٢**	**٧٦.١**
المجموع الكلي	**١٠٣**	**١٩٠٩**	**٣٨٢**	**٢٣**	**١٢**	**١٠**	**٢١**	**٤٢٢**	**١٥**	**٨٨١**
% للإصابة الكلية			**٢٠**	**١.٢**	**٠.٦**	**٠.٥**	**١.١**	**٢٢.١**	**٠.٨**	**٤٦.١**

* جميع العينات المختبرة لم تتفاعل مع المصل المضاد لفيروس تخطط الذرة (MSV)، مختصرات الفيروسات المستخدمة: BYDV-PAV = فيروس تقزم واصفرار الشعير–PAV، BYSMV = اصفرار وموزاييك الشعير المخطط، BSMV = فيروس الموزاييك الشريطي للشعير، WSMV = فيروس الموزاييك المخطط للقمح، WDV = فيروس تقزم القمح.

بينما لم تسجل أية إصابة به في المناطق الأخرى، ويعد هذا التسجيل الأول لفيروس تقزم القمح في سورية.

شوهد خلال المسح وجود نشاط لأنواع مختلفة من حشرات النطاطات (سجل وجودها الغزير في أقل من ١٠% من الحقول الممسوحة)، تم جمع عدة أنواع من النطاطات، كانت السيادة لأربعة أنواع مختلفة مورفولوجياً أحدها شبيه بحشرات النطاطات (*P. alienus*) الناقلة لفيروس تقزم القمح.

٢.١.٣. المسح الحقلي الثاني في سورية (نيسان وأيار، للموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠١٠)

بدت المظاهر المرضية لمجمل العينات المدروسة على هيئة اصفرار وتقزم، نقص في الغلة مع وجود احمرار للأوراق تميزت به نباتات الشوفان بشكل كبير، كما لوحظ وجود أعراض تخططات وموزاييك على الأوراق في بعض الحقول. شهد هذا الموسم نشاط لحشرات النطاطات (سجل وجودها الغزير في حوالي ١٥% من الحقول الممسوحة)، تم جمع عدد من النطاطات تابعة لأربعة أنواع (حيث لوحظت سيادة لتلك الأنواع) مختلفة مورفولوجياً أحدها شبيه بحشرات النطاطات (*P.alienus*) الناقلة لفيروس تقزم القمح.

أظهرت نتائج الاختبار المصلي تفوق واضح لفيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV (BYDV-PAV) في العينات المجموعة بنسبة ٤٢%، واحتل فيروس تقزم القمح (WDV) المرتبة الثانية بنسبة ٢.٣%، أما فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط (BYSMV) فقد كشف في عينات الشعير المجموعة من المنطقتين الشمالية والجنوبية فقط، وبنسبة ١.٩% من إجمالي العينات المجموعة. كما سجلت إصابة بفيروس الموزاييك المخطط للقمح (WSMV) و فيروس الموزاييك الشريطي للشعير (BSMV) بنسبة ١.٥% و ٠.٧%، على التوالي، مع ملاحظة انتشار فيروس الموزاييك المخطط للقمح (WSMV) في حقول القمح لمناطق الدراسة دون حقول الشعير، وعلى العكس كان توزع فيروس الموزاييك الشريطي للشعير (BSMV) مقتصراً على حقول الشعير للمنطقتين الجنوبية والشرقية، وما تميز به هذا الموسم عن الموسم السابق هو تسجيل إصابة بفيروس تخطط الذرة (MSV). في حقول القمح للمنطقة الشرقية بنسبة ٠.٢%. أمكن الكشف عن الإصابة المختلطة بأكثر من فيروس في ١.٥% من العينات المختبرة (جدول ٣.٣).

أشارت نتائج المسح الحقلي إلى انتشار فيروس تقزم القمح في حقول القمح والشعير لكلاً من المنطقة الشرقية والجنوبية، و بنسب إصابة وصلت حتى ٤.١ و ٠.٨% من العينات المختبرة في تلك

المناطق، على التوالي، حيث كانت نسبة الإصابة بالفيروس في حقول الشعير أكبر منها في حقول القمح لتلك المناطق، حيث بلغت في حقول الشعير ٦.٦%، بينما انخفضت في حقول القمح حتى ٢.١%. فيما لم تسجل أي إصابة بفيروس تقزم القمح في المنطقة الشمالية.

اتسم هذا الموسم بنسبة إصابة أعلى مقارنة مع الموسم السابق، حيث بلغت نسبة الإصابة في العينات المجموعة انتقائياً ٤٥.٧%، توزعت بين ٥٩.٢% في عينات الشعير، و٤١.١% في عينات القمح، و٨٧% في عينات الشوفان، و٥٠% في عينات التريتيكالي. لوحظ النشاط الحشري في أغلب الحقول الممسوحة، حيث كانت الظروف المناخية السائدة ومن ورائها الفترة الزمنية التي تم فيها عمليات الجمع دور في زيادة النشاط الحشري وبالتالي زيادة نسبة الإنتشار للأمراض الفيروسية عما هو عليه في الموسم السابق (جدول٢.٣، شكل٢.٣). تراوحت نسب الإصابة التقديرية وفقاً للمشاهدات الحقلية ما بين ١-٥٠%، وتجاوزت الـــ ٨٠% في أحد حقول المنطقة الشرقية. حيث لوحظ تقارب بين نتائج الاختبار المصلي للعينات ونسب الإصابة التقديرية وفقاً للمشاهدات الحقلية، وخصوصاً في الحقل الذي وصلت فيه نسبة الإصابة حتى ٨٠% حيث أظهرت نتائج الـــTBIA وجود فيروس تقزم واصفرار الشعير بنسبة ٧٠% وفيروس تقزم القمح بنسبة ١٠%.

٣.١.٣. المسح الحقلي في لبنان (٧-١٣ نيسان، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩)

كانت الأعراض الملاحظة في الحقول الممسوحة تتمثل بالإصفرار والتقزم بالدرجة الاولى كما شوهدت أعراض تخططات على الأوراق في بعض الحقول. كان النشاط الحشري الملاحظ في الحقول الممسوحة ضعيفاً، حيث شوهدت نطاطات الأوراق (وبكثافة ضعيفة) في ١١% من الحقول الممسوحة.

أشارت نتائج الإختبار المصلي/السيرولوجي إلى انتشار فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV (BYDV-PAV) في عينات الشعير فقط وبنسبة ٩% من مجموع العينات المختبرة، مع العلم أن نسبة انتشاره قي عينات الشعير بلغت ١٣.٨%. سجل فيروس الموزاييك المخطط للقمح (WSMV) وجود في عينات القمح بنسبة ٠.٤%، من مجموع العينات المختبرة. فيما لم تسجل أية إصابة بباقي الفيروسات المختبرة (جدول ٤.٣، شكل ٣.٣). لوحظ تداخل بين الأعراض الناجمة عن الأمراض الفطرية، أو حتى الأثر المتبقي للمبيدات العشبية الملاحظ إستخدامها في تلك المناطق، والأعراض الناجمة عن الإصابة بالأمراض الفيروسية، وبالتالي كان هناك تباين بين نسبة الإصابة بالاعتماد على

المشاهدات الحقلية (التي تراوحت بين ٠–٢٥% في كل من حقول القمح والشعير) وبين نتائج الاختبارات المصلية/السيرولوجية.

جدول ٢.٣. الإختلافات المناخية في المناطق الشمالية، الجنوبية، والشرقية في سورية خلال المسحين الحقلين اللذان أجريا خلال الموسمين الزراعيين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و ٢٠٠٩/٢٠١٠ في سورية.

	الموسم الزراعي الأول 2008/2009			**الموسم الزراعي الثاني 2009/2010**		
	الشمالية	**الجنوبية**	**الشرقية**	**الشرقية**	**الشمالية**	**الجنوبية**
موعد أخذ العينات	19-21/٤	٧- ٩/٤	٢٩/٤- ٥/٥	14-18/٤	12-16/٥	٣٠/٤- ٢/٥
درجة الحرارة °س	18	١٦	٢٣	19	٢٥	٢١
الرطوبة النسبية%	56	٦٠	٣٥	٤٠	٤٥	٤٩
سرعة الرياح ساعة/كم	٥	٥	١٣	١٤	١٢	٩

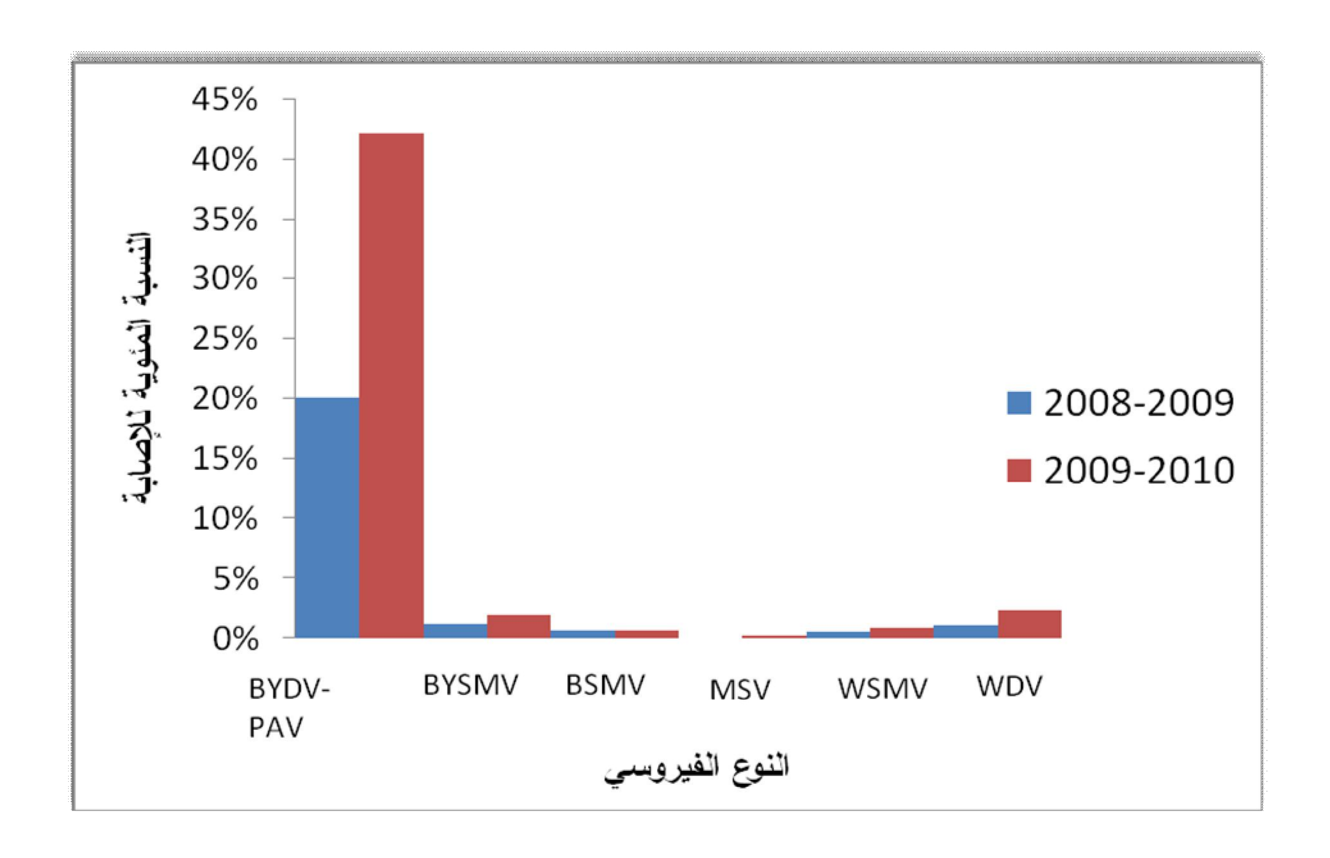
المصدرمن الموقع الإلكتروني (www.underground.com)

جدول ٣.٣. نتائج تفاعل عينات المحاصيل النجيلية المجموعة من سورية (نيسان وأيار، للموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠١٠) مع الأمصال المضادة باستخدام اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA).

المحصول/ المحافظة	عدد الحقول الممسوحة	عدد العينات المختبرة	عدد العيّنات التي تفاعلت إيجابياً مع الأمصال*						عدد العينات المصابة بفيروس واحد	عدد العينات المصابة بأكثر من فيروس	عدد العينات السليمة
			BYDV-PAV	BYSMV	BSMV	WSMV	MSV	WDV			
محصول القمح											
حلب	٦	١٢٥	٢٢	٠	٠	٤	٠	٠	٢٢	٢	١٠٣
إدلب	٤	٧٥	١٢	٠	٠	٦	٠	٠	١٨	٠	٥٧
درعا	١٣	٣٠١	١٥٦	٠	٠	٨	٠	٢	١٥٨	٤	١٤٣
السويداء	١٠	١٩٨	٧٩	٠	٠	٣	٠	٠	٨٠	١	١١٨
الرقة	١١	١٧١	٦٣	٠	٠	٠	٠	٦	٦٥	٢	١٠٦
دير الزور	٩	١٥٢	٥٥	٠	٠	٠	٠	٠	٥٥	٠	٩٧
الحسكة	١٧	٢٦٩	١٢٠	٠	٠	٤	٣	١٤	١٣٣	٤	١٣٦
مجموع القمح	**٧٠**	**١٢٩١**	**٥٠٧**	**٠**	**٠**	**٢٥**	**٣**	**٢٢**	**٥٣١**	**١٣**	**٧٦٠**
% لإصابة القمح			**٣٩.٣**	**٠**	**٠**	**١.٩**	**٠.٢**	**١.٧**	**٤١.١**	**١**	**٥٨.٩**
محصول الشعير											
حلب	٤	٤٥	٢٠	٣	٠	٠	٠	٠	٢١	١	٢٤
إدلب	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
درعا	٣	٥٥	٢٧	١٩	١	٠	٠	٣	٤٧	١	٨
السويداء	٣	٥٠	٢٣	١٠	٠	٠	٠	٠	٣٣	٠	١٧
الرقة	٣	٣٥	١٨	٠	٣	٠	٠	٥	١٨	٤	١٧
دير الزور	٢	٢٦	١١	٠	٠	٠	٠	١	١٢	٠	١٤
الحسكة	٦	٧٦	٣٥	٠	٧	٠	٠	٧	٣٩	٥	٣٧
مجموع الشعير	**٢١**	**٢٨٧**	**١٣٤**	**٣٢**	**١١**	**٠**	**٠**	**١٦**	**١٧٠**	**١١**	**١١٧**
% لإصابة الشعير			**٤٦.٧**	**١١.١**	**٣.٨**	**٠**	**٠**	**٥.٦**	**٥٩.٢**	**٣.٨**	**٤٠.٨**
الشوفان											
الحسكة	٣	٤٦	٤٠	٠	٠	٠	٠	٠	٤٠	٠	٦
مجموع الشوفان	**٣**	**٤٦**	**٤٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**٤٠**	**٠**	**٦**
% لإصابة الشوفان			٨٧	٠	٠	٠	٠	٠	٨٧	٠	١٣
تريتيكالي											
الحسكة	٢	٣٠	١٥	٠	٠	٠	٠	٠	١٥	٠	١٥
مجموع تريتيكالي	**٢**	**٣٠**	**١٥**	**٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**١٥**	**٠**	**١٥**
% لإصابة تريتيكالي			**٥٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**٠**	**٥٠**	**٠**	**٥٠**
المجموع الكلي	**٩٦**	**١٦٥٤**	**٦٩٦**	**٣٢**	**١١**	**٢٥**	**٣**	**٣٨**	**٧٥٦**	**٢٤**	**٨٩٨**

% للإصابة الكلية			٤٢	١.٩	٠.٦	١.٥	٠.٢	٢.٣	٤٥.٧	١.٥	٥٤.٣

* مختصرات الفيروسات المستخدمة: BYDV-PAV = فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV، BYSMV = اصفرار وموزاييك الشعير المخطط، BSMV = فيروس الموزاييك الشريطي للشعير، WSMV = فيروس الموزاييك المخطط للقمح، WDV = فيروس تقزم القمح.

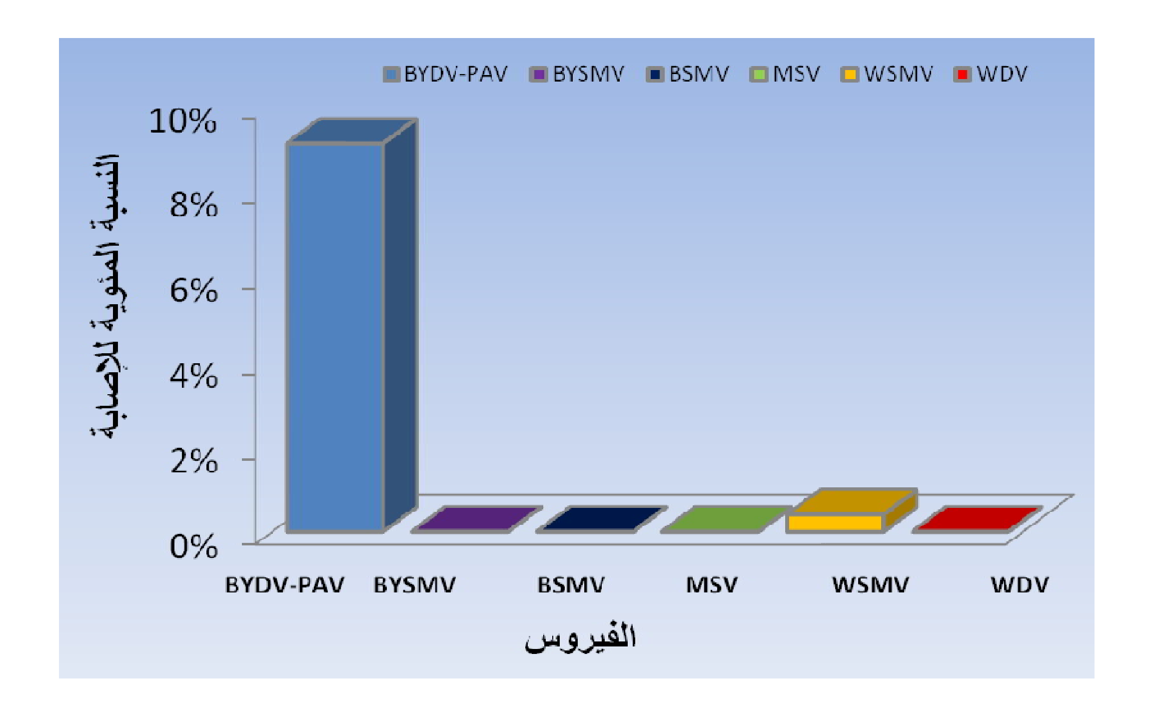


شكل ٢.٣. مخطط بياني يبين الإختلافات في نسبة انتشار الفيروسات في سورية خلال الموسمين الزراعيين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و ٢٠٠٩/٢٠١٠.

جدول ٣.٤. نتائج تفاعل عينات المحاصيل النجيلية المجموعة من لبنان (١٣–١٧ نيسان، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩) مع الأمصال المضادة باستخدام إختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA).

المحصول/المحافظة	عدد الحقول الممسوحة	عدد العينات المختبرة	عدد العيّنات التي تفاعلت إيجابياً مع الأمصال*						عدد العينات المصابة بفيروس واحد	عدد العينات المصابة بأكثر من فيروس	عدد العينات السليمة
			BYDV-PAV	BYSMV	BSMV	WSMV	MSV	WDV			
محصول القمح											
الحلانية	٢	٣٠	٠	٠	٠	١	٠	٠	١	٠	٣٤
طاليا	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
الهرمل	٢	٢٨	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٣٠
الفيضا	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
عميق	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
قب إلياس	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
تربول	٢	٣٢	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٤٢
مجموع القمح	٦	٩٠	٠	٠	٠	١	٠	٠	١	٠	١٠٦
% لإصابة القمح			٠	٠	٠	**1.1**	٠	٠	٠.٩	٠	٩٩.١
محصول الشعير											
الحلانية	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
طاليا	٢	٣٠	٦	٠	٠	٠	٠	٠	٦	٠	٦
الهرمل	٢	٢٥	٣	٠	٠	٠	٠	٠	٣	٠	٣
الفيضا	٢	٣٥	٧	٠	٠	٠	٠	٠	٧	٠	٧
عميق	٢	٣٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	١	٠	١
قب إلياس	١	١٥	٢	٠	٠	٠	٠	٠	٢	٠	٢
تربول	٢	٣٩	٥	٠	٠	٠	٠	٠	٥	٠	٥
مجموع الشعير		١٧٤	٢٤	٠	٠	٠	٠	٠	٢٤	٠	٢٤
% لإصابة الشعير			١٣.٨	٠	٠	٠	٠	٠	١٣.٨	٠	١٣.٨
المجموع الكلي	١٧	٢٦٤	٢٤	٠	٠	١	٠	٠	٢٥	٠	٢٥
% للإصابة الكلية			٩	٠	٠	٠.٣	٠	٠	٩.٥	٠	٩.٥

* مختصرات الفيروسات المستخدمة: BYDV-PAV = فيروس تقزم واصفرار الشعير–PAV، BYSMV = اصفرار وموزاييك الشعير المخطط، BSMV = فيروس الموزاييك الشريطي للشعير، WSMV = فيروس الموزاييك المخطط للقمح، WDV = فيروس تقزم القمح.

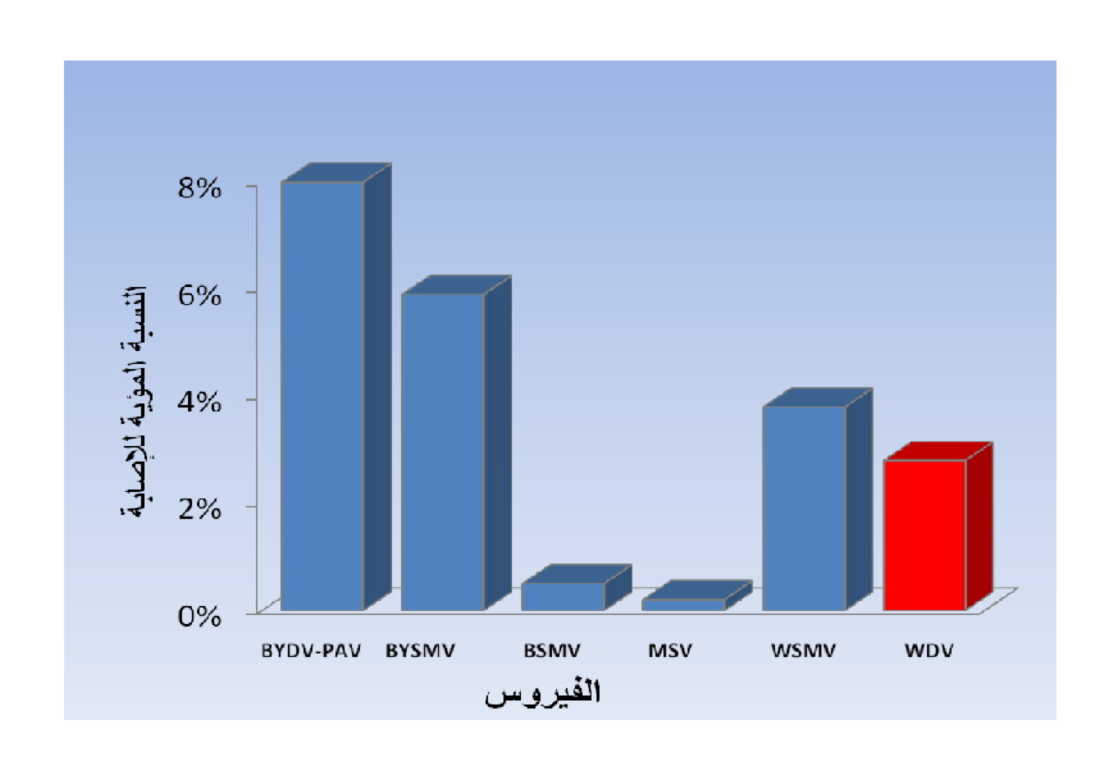


شكل ٣.٣. مخطط بياني يبين توزع الفيروسات على محصولي القمح والشعير في لبنان خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠٠٨.

٣.١.٤. المسح الحقلي في تركيا (١٠–١٦ حزيران، للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩)

تعتبر أعراض الاصفرار والتقزم هي من أهم الأعراض الملاحظة في حقول القمح والشعير التي أجريت عليها عمليات المسح مع ملاحظة تدرجات لونية كاحمرار خفيف وتواجد لتحززات وموزاييك بدرجة أقل. تراوحت نسبة الإصابة بالإعتماد على المشاهدات الحقلية بين ٠–٥٠% في حقول القمح والشعير.

كشفت نتائج الاختبارات المصلية للعينات المختبرة أن فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV (BYDV-PAV) كان الأكثر انتشاراً في جميع المناطق المدروسة بنسبة وصلت حتى ٧.٤% من مجموع العينات المختبرة، واحتل فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط (BYSMV) المخطط المرتبة الثانية بنسبة وصلت حتى ٥.٩%، مع ملاحظة تركز الإصابة بهذا الفيروس في المنطقة وسط الأناضول فقط، فيما لم يسجل في باقي المناطق. وصلت نسبة الإصابة فيروس الموزاييك المخطط للقمح (WSMV) ٣.٨%، وكان انتشاره يشمل منطقتي الدراسة. بلغت نسبة الإصابة بفيروس تقزم القمح (WDV) ٢.٨%، وسجل في الأجزاء الجنوبية من منطقة وسط الأناضول (قرة مان، وقونية) فقط دون وجود إصابات في المناطق الاخرى، وتُعدّ هذه الإشارة الأولى لانتشار فيروس تقزم القمح في تلك المنطقة. كشف عن فيروس تخطط الذرة (MSV) وفيروس الموزاييك الشريطي للشعير (BSMV) بنسبة ٠.٢% و ٠.٥% من مجموع العينات المختبرة، على التوالي، وكان انتشارها في محافظات منطقة وسط الأناضول، ولم تسجل أية إصابة بهذين الفيروسين في محافظات منطقة بحر مرمرة. أمكن الكشف عن الإصابة المختلطة بأكثر من فيروس في ١.٥% من العينات المختبرة (جدول ٥.٣، شكل ٤.٣). لوحظ انتشار لنطاطات الاوراق في حوالي ٤٠% من الحقول الممسوحة، وتركزت في حقول القمح فقط، حيث كانت السيادة لثلاث أنواع مختلفة مورفولوجياً أحدها شبيه بحشرات النطاطات (*P.alienus*) الناقلة لفيروس تقزم القمح.



شكل ٤.٣. مخطط بياني يبين توزع الفيروسات على محصولي القمح والشعير في تركيا خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠٠٨.

جدول ٥.٣.نتائج تفاعل عينات المحاصيل النجيلية المجموعة من تركيا (١٠-١٦ حزيران، للموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠٠٨) مع الأمصال المضادة باستخدام إختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA).

المحصول/المحافظة	عدد الحقول الممسوحة	عدد العينات المختبرة	عدد العيّنات التي تفاعلت إيجابياً مع الأمصال*						عدد العينات المصابة بفيروس واحد	عدد العينات المصابة بأكثر من فيروس	عدد العينات السليمة
			BYDV-PAV	BYSMV	BSMV	WSMV	MSV	WDV			
محصول القمح											
أنقرة	٤	١٧٠	٥	٢٢	٠	٥	٤	٠	٢٥	٣	١٤٥
اسكيشهر	٥	٢٠٣	٨	١٨	٠	١٣	٠	٠	٢٣	٨	١٨٧
قرة مان	٥	١٩٥	١١	٢٥	٠	٢	٠	٢٤	٥٢	٤	١٤٣
أق سراي	٥	٢٠٥	٦	٢٤	٠	٥	٠	٠	٣١	٢	١٨٤
قونية	٥	٢٢٠	٧	٢٠	٠	٦	٠	٣٦	٥٩	٢	١٦١
بيلجيك	٥	٢٤٥	٢٢	٠	٠	١٥	٠	٠	٢٧	٥	٢١٨
أدرنة	٥	٢٤٠	١٥	٠	٠	٣	١	٠	١٩	٠	٢٢١
ساكاريا	٥	٢٢٢	٢٦	٠	٠	١٧	٠	٠	٣٩	٢	١٨٣
تيكرداغ	٥	٢٧٣	٤٠	٠	٠	١٦	٠	٠	٥٦	٠	٢١٧
مجموع القمح	**٤٤**	**١٩٧٣**	**١٢٧**	**١٠٩**	**٠**	**٨٢**	**٥**	**٦٠**	**٣٣١**	**٢٦**	**١٦٥٩**
% لإصابة القمح			**٦.٤**	**٥.٥**	**٠**	**٤.٢**	**٠.٣**	**٣**	**١٦.٨**	**١.٣**	**٨٤.١**
محصول الشعير											
أنقره	٢	٨٥	١٣	٢٠	١١	٠	٠	٠	٣٨	٦	٤٧
أدرنة	٢	١١٥	٢٠	٠	٠	٠	٠	٠	٢٠	٠	٩٥
مجموع الشعير	**٤**	**٢٠٠**	**٣٣**	**٢٠**	**١١**	**٠**	**٠**	**٠**	**٥٨**	**٦**	**١٤٢**
% لإصابة الشعير			**١٦.٥**	**١٠**	**٥.٥**	**٠**	**٠**	**٠**	**١١٦**	**١٢**	
المجموع الكلي	**٤٨**	**٢١٧٣**	**١٦٠**	**١٢٩**	**١١**	**٨٢**	**٥**	**٦٠**	**٣٨٩**	**٣٢**	**١٨٠١**
% للإصابة الكلية			**٧.٤**	**٥.٩**	**٠.٥**	**٣.٨**	**٠.٢**	**٢.٨**	**١٧.٩**	**١.٥**	**٨٢.٩**

* مختصرات الفيروسات المستخدمة: BYDV-PAV = فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV، BYSMV = اصفرار وموزاييك الشعير المخطط، BSMV = فيروس الموزاييك الشريطي للشعير، WSMV = فيروس الموزاييك المخطط للقمح، WDV = فيروس تقزم القمح.

٢.٣. الاختبارات الجزيئية

تطابقت نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) مع مثيلاتها في اختبار بصمة النسيج البناتي المناعي (TBIA)، وأمكن تضخيم الحمض النووي الفيروسي للعينات المختبرة (6 عينات) ثلاث عينات معزولة من القمح والأخرى معزولة من الشعير، باستخدام زوج البادئات المتخصص بالكشف عن فيروس تقزم القمح، حيث أعطت جميع العينات عصابة (حزمة) بالحجم المطلوب (٢٥٣ زوج قاعدي) (شكل ٥.٣).

٣.٣. تحديد تتالي نيكليوتيدات المنطقة المشفرة لبروتين التضاعف الفيروسي للعزلة المدروسة

تم تحديد تتالي نكليوتيدات قطعة الـــ DNA (٢٥٣ زوج قاعدي) من إطار القراءة المفتوح الثاني ORF2 والتي تشفر بروتين التضاعف الفيروسي للعزلتين SB1248-09 و SW 2131-٠٩ من فيروس تقزم القمح (شكل ٦.٣)، وعند مقارنة التتاليات النكليوتيدية التي تم الحصول عليها مع التتاليات النيكليوتيدية لعزلات من نفس الفيروس موجودة في بنك المورثات (Gen Bank)، وذلك باستخدام برنامج البحث عن الإصطفافات في قاعدة البيانات (BLAST)، تبين بأن العزلة المدروسة SB1248-09 مشابهة للعزلة الإيرانية (رقم البنك الوراثي FJ620684.1) من فيروس تقزم الشعير بنسبة ٩٩%، وبنسبة ٩٢% مع العزلات الأوربية لفيروس تقزم القمح المعزولة من شعير [العزلتين الألمانيتين (رقم البنك الوراثي AM942044.1) و (رقم البنك الوراثي AM942045.1) والعزلة الهنغارية (رقم البنك الوراثي FM999832.1)]. أما العزلة SW2131-09 أظهرت تشابهاً بنسبة ٩٨-١٠٠%مع معظم العزلات الأوربية من فيروس تقزم القمح المعزولة من قمح ومن هذه العزلات نذكر العزلة التشيكية (رقم البنك الوراثي FJ546191.1)، الألمانية (رقم البنك الوراثي AM296023.1)، الهنغارية (رقم البنك الوراثي FN806786.1)، الفرنسية (رقم البنك الوراثي X82104.1)، الأوكرانية (رقم البنك الوراثي FN806784.1)، السويدية (رقم البنك الوراثي AJ311031.1) كذلك العزلة الصينية (رقم البنك الوراثي EF536868.1).

كما أوضحت شجرة القرابة الوراثية المرسومة باستخدام برنامج: (DNAMAN LynnonBiosoft , Canada version 4.0)، وجود مجموعتين منفصلتين، ضمت المجموعة الأولى عزلات لفيروس تقزم القمح معرَفة على نباتات قمح، بينما ضمت المجموعة الثانية عزلات لنفس الفيروس لكن معرّفة على نباتات شعير، ولوحظ من الدراسة أن العزلة السورية SW 2131-09 المعزولة من نبات قمح توضعت ضمن المجموعة الأولى حيث تتواجد العزلات الأوربية لفيروس تقزم القمح والمعزولة من نباتات

قمح، بينما توضعت العزلة السورية09-SB 1248 المعزولة من نبات شعير ضمن المجموعة الثانية التي تضم العزلات الأوربية والإيرانية لفيروس تقزم القمح والمعزولة من نباتات شعير. ووصلت نسبة التطابق بين المجموعتين حتى ٨٦% (شكل ٧.٣).

تم إيداع تتالي النكليوتيدات الذي تم الحصول عليه للعزلتين SB1248-09 و09-SW 2131 من فيروس تقزم القمح فب بنك المورثات وتم قبولها تحت الرمزين HQ113096.1 و HQ113095.1، على التوالي.

٤.٣. تقدير كفاءة بعض أنواع حشرات النطاطات في نقل الفيروس

أظهر نطاط الأوراق من النوع (Ribaut) *Psammotettix provincialis* الذي تم تصنيفه في قسم الحشرات، المتحف البريطاني (التاريخ الطبيعي) (شكل ٨.٣)، كفاءة عالية وصلت حتى ٩٥% في نقله للعزلة SB1248-09 من فيروس تقزم القمح، وذلك عندما أجريت عملية الاكتساب والعدوى للفيروس على نباتات شعير، فيما فشل هذا النوع من نطاطات الأوراق في نقل كلاً من العزلة SB1248-09 إلى نباتات قمح، والعزلة SW2131-09 إلى نباتات شعير وقمح. وقد فشلت أيضاً جميع محاولات نقل العزلتين المدروستين بواسطة أنواع النطاطات الأخرى، لذلك لم يتم العمل على تصنيفها والعمل بها. ويعد هذا التسجيل الأول في سورية لهذا النوع من نطاطات الأوراق، والتسجيل الأول عالمياً لقدرة النطاط *Psammotettix provincialis* في نقل فيروس تقزم القمح.

٥.٣. المدى العوائلي لفيروس تقزم القمح

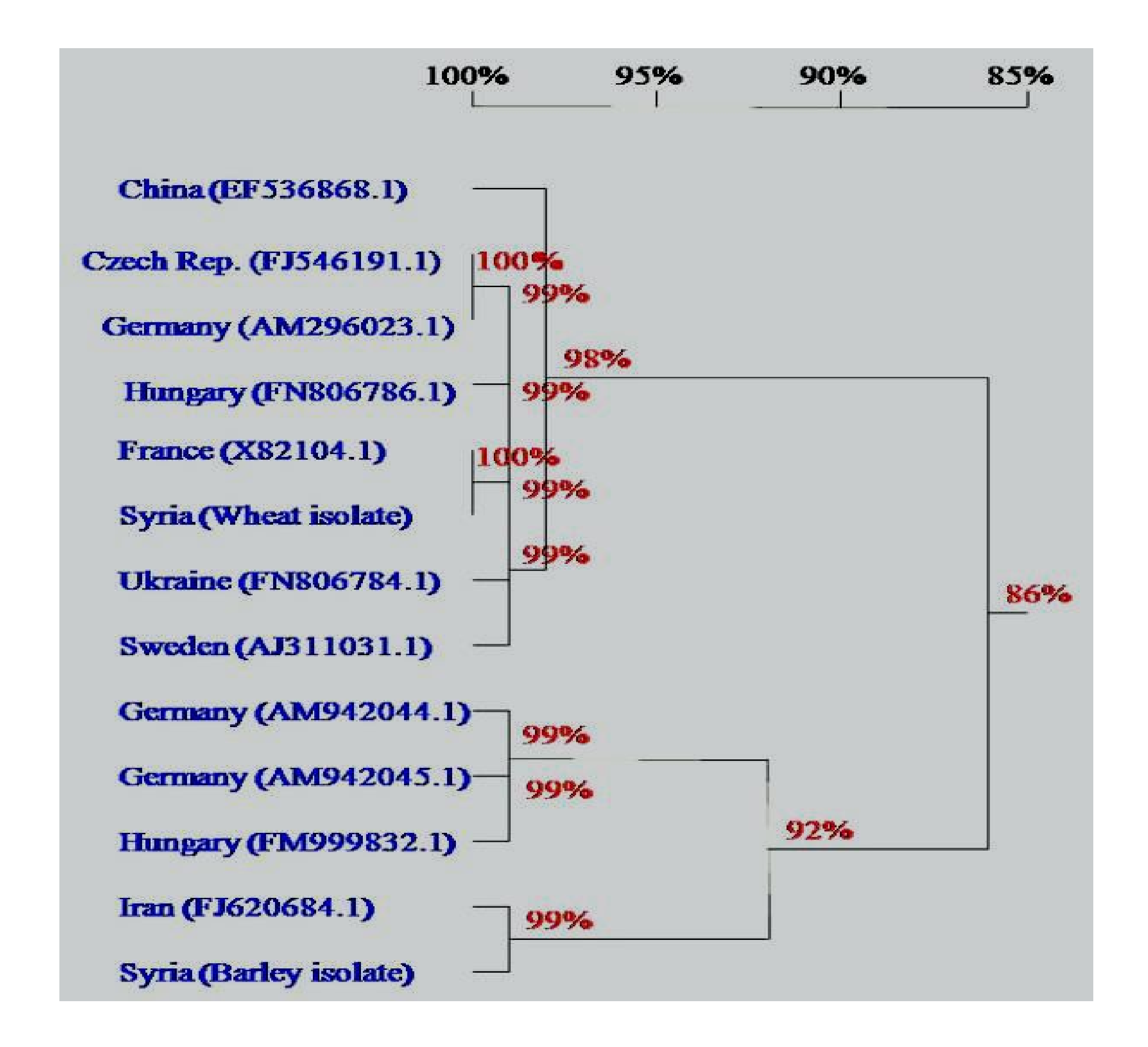
عند دراسة المدى العوائلي للعزلة SB1248-09 من فيروس تقزم القمح على مجموعة من المحاصيل النجيلية، بينت النتائج أن الفيروس يصيب كلاً من النوعين: الشعير والشوفان بنسبة وصلت إلى ٩٥% و ٩٠%، على التوالي. فيما لم تسجل أية إصابة على الأنواع الأخرى المستخدمة في الدراسة. كانت أعراض التقزم والاصفرار من أهم الأعراض الملاحظة على نباتات الشعير، بينما اقتصرت الأعراض على نباتات الشوفان في احمرار في الأوراق وخصوصاً النهايات الطرفية (شكل ٩.٣).



شكل ٣.٥. اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) لستة عينات نباتية تفاعلت مع المصل المضاد لفيروس تقزم القمح (WDV)، باستخدام زوج بادئات متخصص بالكشف عن الفيروس. ١=عينة قمح من سورية (SW 2131-09)، ٢=عينة قمح مصابة من تركيا (TW 4277-09)، ٣= عينة قمح مصابة من تركيا (TW 4343-09)، ٤=عينة شعير مصابة من سورية (SB 1248-09)، ٥=عينة شعير بعد إعادة العدوى، ٦=عينة من السويد تستخدم كشاهد إيجابي، ٧=عينة شعير سليمة (غير مصابة)، M= مؤشر الوزن الجزيئي.

TGGAAAGACTTCCTGGGCAAGGTCTCTAGGGACACATAATTATTATAACAGTCT
AGTTGATTTCACAACATATGACGTCAACGCCAATGATAATATCATCGACGACAT
TCCATTCAAGTTCACACCCAACTGGAAGTGCTTCGTCGGGGCTGAGCGTGACT
TCACGGTCAATCCAAAATATGGTAAGCGAAAAGTAATACGGGGTGGAATACCT
GCTCATTTTAGTTAATCCAGACGAAGATTGGCTCAACTT

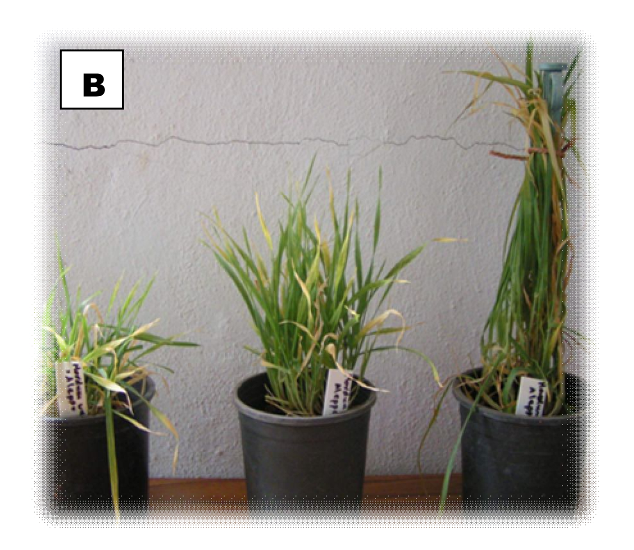
شكل ٣.٦. تتالي النوكليوتيدي لقطعة بحجم ٢٥٣ زوج نوكليوتيدي من المنطقة التي تشفر بروتين التضاعف الفيروسي للعزلة السورية SB1248-09 من فيروس تقزم القمح.



شكل ٣.٧.شجرة القرابة الوراثية المرسومة بطريقة Neighbor Joining بالاعتماد على التتالي النيكليوتيدي للمنطقة المشفرة لبروتين التضاعف الفيروسي للعزلات الفيروسية من فيروس تقزم القمح.



شكل ٣.٨. الحشرة الكاملة لنطاط الأوراق Ribaut *Psammotettix provinicialis*.



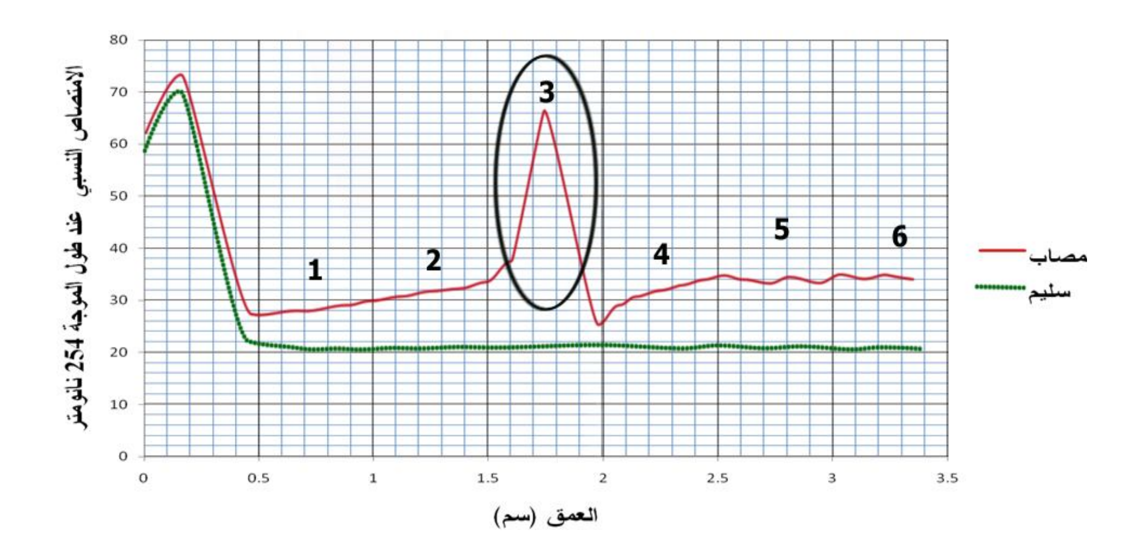


شكل ٣.٩.أعراض الإصابة بالعزلة السورية SB1248-09 من فيروس تقزم القمح على نباتات الشوفان (A) والشعير (B).

٦.٣. عزل الفيروس وتنقيته وإنتاج مصل مضاد له

تمّ الحصول على ٢ كغ من النسيج النباتي المصاب بالفيروس، وذلك بمضاعفة العزلة الفيروسية SB1248-09 على نباتات شعير تمّ نقل العدوى إليها بواسطة حشرات نطاطات الأوراق *P. provincialis*. بعد وضع المحضر الفيروسي المنتقى جزئياً على أنابيب السكروز المتدرجة التركيز، وتعريض الأنابيب لطرد المركزي فائق السرعة، وبمقارنة نمط الامتصاص النسبي للأشعة فوق البنفسجية (عند موجة طولها ٢٥٤ نانومتراً) للأنبوب الحاوي على مستخلص النباتات المصابة مع ذلك الحاوي على مستخلص النباتات السليمة (شكل ١٠.٣)، لوحظ وجود طبقة (band) واحدة فقط في الأنبوب الذي يحتوي على مستخلص النباتات المصابة (شكل ١١.٣)، تمّ فصلها بجهاز الفصل عند موجة طولها ٢٥٤ نانومتراً (شكل ١٢.٣)، تمّ التأكد من وجود الفيروس النقي بوساطة اختبار الارتباط المناعي النقطي (Dot-blot) باستعمال المصل المضاد (متعدد الكلون) رقم As#0216 المخصص بالكشف عن فيروس تقزم القمح، وذلك بفحص كل منطقة جمع منها المحضر المجزئ بجهاز الفصل بما فيها المنطقة الحاوية على الفيروس المنقى وهي المنطقة الوحيدة التي أعطت تفاعل إيجابي واضح. حسبت نسبة مقدار امتصاص الفيروس النقي للأشعة فوق البنفسجية عند طول الموجة ٢٦٠ إلى تلك عند طول موجة ٢٨٠ نانومتراً فكانت ١.٢٧، وعند حساب كمية الفيروس النقي المتحصل عليها باستخدام معامل التميز (Extinction Coefficient) وقدره ٧.٧، تمّ الحصول على كمية تعادل ٢.٢- ٢.١٨ ميكروغرام من الفيروس النقي لكل كيلوغرام من النسيج المصاب.

تم انتاج مصل متعدد الكلون ضد العزلة السورية SB1248-09 من فيروس تقزم القمح، بعد الحصول على المحضر الفيروسي النقي وحقنه في جسم الأرنب. وعند دراسة فاعلية المصل المنتج بواسطة اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي، وجد أن المصل المنتج ذو نوعية جيدة واستطاع الكشف عن الفيروس بحساسية جيدة وكانت الفروق بين النبات المصاب والنبات السليم كبيرة. كما استطاع هذا المصل عند تخفيفه حتى ١:٢٥٦٠٠٠ في سحبة الدم الرابعة أن يكشف عن فيروس تقزم القمح (شكل ١٣.٣)، واستمر المصل بالكشف عن الفيروس حتى عند سحبة الدم الثامنة (جدول ٦.٣).



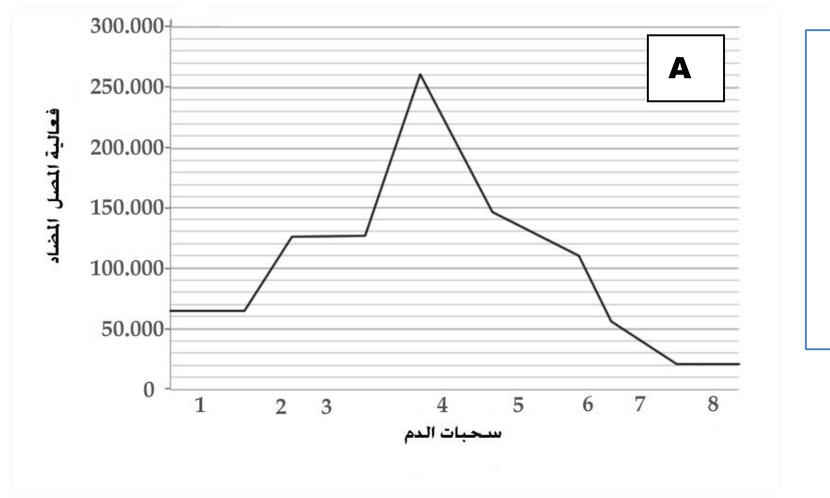
شكل ٣.١٠. الإمتصاص النسبي للأشعة فوق البنفسجية عند موجة طولها ٢٥٤ نانومتراً للمحضر الفيروسي المستخلص من نباتات شعير مصابة بالعزلة SB 1248-09 من فيروس تقزم القمح (الخط الأحمر)، وللمحضر المستخلص من نباتات شعير سليمة (الخط الأخضر). تمثل الأرقام (من ١ إلى ٦) المناطق التي جمع فيها المحضر للتأكد من وجود الفيروس.

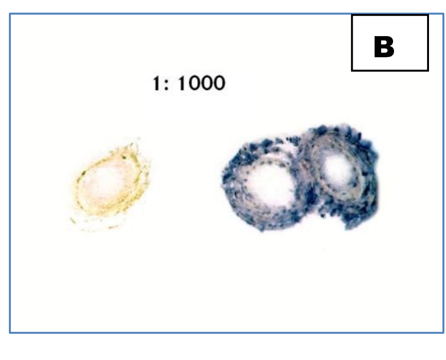


شكل ٣.١١. طبقة الفيروس النقي المتشكلة في أنبوب السكروز متدرج التركيز.



شكل ١٢.٣. جهاز فصل الفيروس من أنبوب السكروز المتدرج التركيز عند موجة طولها ٢٥٤ نانومتراً.





شكل ١٣.٣. (A) فعالية المصل المضاد لثمانية سحبات دم من أرنب محقون بالعزلة SB 1248-09 من فيروس تقزم القمح، (B) تلون الأوعية اللحائية لساق النبات المصاب بفيروس تقزم القمح عند الكشف عنه باستخدام اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (TBIA)؛ مقطع النبات السليم على اليسار ومقطع النبات المصاب على اليمين عند استخدام المصل المنتج عند السحبة الرابعة وبتخفيف ١:١٠٠٠.

جدول ٦.٣. يبين فعالية المصل المضاد المنتج ضد العزلة المحلية SB 1248-09 من فيروس تقزم القمح، تم اختبار ثمانية تخفيفات لكل سحبة من ثمانية سحبات دم من الأرنب المحقون بالفيروس المدروس.

التخفيفات	سحبات دم الأرنب (أسبوع)							
	1	2	3	4	5	6	7	٨
1/1000	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1/2000	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1/4000	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
1/8000	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
1/16000	+	+++	++	+++	++	++	++	++
1/32000	+	++	++	+++	++	++	++	+
1/64000	+	++	++	++	++	+	+	−
١/128000	−	+	+	++	+	−	−	−
١/٢٥٦٠٠٠	−	−	−	+	−	−	−	−

+ : متوسط الفعالية.

++ : جيد الفعالية.

+++ : ذو فاعلية عالية جداً

المناقشة

أكدت نتائج المسوحات الحقلية في سورية خلال الموسمين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و ٢٠٠٩/٢٠١٠ وفي تركيا ولبنان خلال موسم واحد ٢٠٠٨/٢٠٠٩، أن أعراض التقزم والاصفرار هي أكثر الأعراض مشاهدة في الحقول الممسوحة مع تردد لأعراض موزاييك وتخطط واحمرار بنسب قليلة. كما بينت النتائج أن كلاً من فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV، فيروس تقزم القمح، وفيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط، هي المسببات الرئيسية لأعراض التقزم والاصفرار على كلاً من القمح والشعير تحت ظروف الإصابة الطبيعية في الدول الثلاث، وقد تباينت نسب توزع هذه الفيروسات وانتشارها على نحو واسع تبعاً للمحصول، والموقع الجغرافي، والموسم الزراعي، وهذا يتفق مع دراسات سابقة (العنسي، ٢٠٠٧؛ Köklü, 2004؛ Makkouk & Skaf, 1989؛ Makkouk *et al.*, 1990, 2001).

أبدى محصول الشعير حساسية أكبر من محصول القمح للإصابة بالأمراض الفيروسية المدروسة وقد يعزى ذلك إلى عدة أسباب منها قلة عمليات الخدمة الزراعية المقدمة لحقول الشعير بشكل عام، بما فيها عمليات المكافحة الكيميائية للحشرات المتواجدة في هذه الحقول، وكذلك الزراعة المبكرة لبعض حقول الشعير بقصد الرعي والتي تشكل مكاناً ملائماً لتشتية الحشرات بعد أن تقوم هذه الحشرات بتغذية الإلقاح ضمن هذه الحقول، ولتصبح بعد ذلك تلك الحقول بؤرة للإصابة مع خروج حوريات الحشرات في الربيع. ويضاف لذلك قلة اهتمام المزارع بالبحث عن بذار شعير موثوق والإعتماد على ما لديه من مخزون في العام السابق. يلعب ذلك كله دور في زيادة حجم الخسائر الناتجة عن الأمراض الفيروسية المنقولة بالحشرات أو المنقولة بالبذور في حقول الشعير وهذا تؤكده الدراسات السابقة (Kumari *et al.,* 2006؛ Lapierre & Hariri, 2008؛ Makkouk *et al.,* 2001).

بينت نتائج الاختبارات المصلية للعينات المجموعة انتقائياً أن فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV كان أكثر الفيروسات تردداً وانتشاراً في جميع حقول القمح والشعير الممسوحة في الدول الثلاث المذكورة. ويعزى ذلك إلى قدرة هذا الفيروس على الانتشار الكبير من خلال وجود عدة أنواع من حشرات المنّ الناقلة له ومداه العوائلي الذي يشمل العديد من الأعشاب النجيلية البرية المعمرة. وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما تم التوصل إليه في العديد من الأبحاث في كل من سورية، لبنان وتركيا (العنسي وآخرون ٢٠٠٧؛ İlbağı *et al.*, 2005؛ Köklü, 2004؛ Makkouk, 1987؛ Makkouk & Skaf, 1989؛ Makkouk *et al.*, 1990).

وخلافاً لما تم ذكره عن فيروس تقزم واصفرار الشعير عام ١٩٨٢ عند التسجيل الأول له في سورية، حيث عُدّ آنذاك مرضاً ثانوي الأهمية وسجل في ٧.٦% من الحقول الممسوحة وبنسبة إصابة ٥.١–٥.٥% في الحقل الواحد (Mamluk & van Leur, 1984)، فقد وصلت نسبة الإصابة بفيروس تقزم واصفرار الشعير في بعض حقول الشعير في محافظة الحسكة خلال الموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩ حتى ٩٠% من العينات المجموعة، الأمر الذي يشير إلى أهمية تطبيق المكافحة المتكاملة للقضاء أو تخفيف الضرر الناجم عن هذا الفيروس وخصوصاً في تلك المناطق، فهو يعد من الأمراض المهمة إقتصادياً بالنظر إلى نسبة الضرر المتحصل عليها.

كما أشارت نتائج الاختبارات المصلية إلى تسجيل فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط على محصول الشعير تحت ظروف الإصابة الطبيعية في كل من الموسمين الزراعيين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و ٢٠٠٩/٢٠١٠ وبنسبة إصابة بلغت ٢.٤% و ١١.١%، على التوالي، وجاءت هذه النتيجة مخالفة لما تم ذكره من قبل مكوك وآخرون (٢٠٠٨)، من عدم تسجيل فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط على محصول الشعير في المنطقة العربية، حيث تركزت الإصابة بهذا الفيروس في المنطقة الجنوبية من سورية مع ملاحظة وجود ثلاث عينات مصابة في إحدى حقول محافظة حلب وذلك في الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠١٠. ويمكن تفسير ذلك بتوافر الظروف المناسبة لانتشار نطاطات الأوراق الناقلة لهذا الفيروس وخصوصاً مع موعد الزراعة المبكر في تلك المنطقة حيث تشكل بادرات الشعير مكاناً جيداً لقضاء فترة التشتية، بعد القيام بعمليات تغذية على هذا المحصول، قد يكون منها تغذية إلقاح إذا كانت هذه النطاطات حاملة للفيروس وكذلك فإن هذه المنطقة تتميز بزراعتها لأصناف القمح القاسي بنسبة تفوق القمح الطري. ومن المعروف أن هناك حساسية لأصناف القمح للإصابة بفيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط (Milne & Conti, 1986)، وهذا يفسر أيضاً عدم وجود إصابة بهذا الفيروس في حقول المنطقة الشرقية وخصوصاً في الموسم الزراعي ٢٠٠٩/٢٠١٠، حيث كانت أصناف القمح الطري تغرق في بحر من الأصداء. حتى أن النسبة التي سجلت في المنطقة الشرقية لا تعتبر ذات أهمية اقتصادية وهذا موافقاً لما تم تسجيله من قبل Milne و Conti (١٩٨٦)، حيث لم يسجل له أية أهمية اقتصادية. وفي لبنان فقد كان محصولي القمح والشعير بمنأى عن الإصابة بفيروس اصفرار وموزاييك الشعير ولعل التبكير في موعد جمع العينات كان مبرراً لذلك، حيث لم نلاحظ نشاط واضح لنطاطات الأوراق أي ربما لم تكمل فترة السكون (فترة حضانة) بشكل كامل مع الأخذ بعين الإعتبار الفوارق الكبيرة في الهطول المطري بين مناطق الجمع في لبنان والمنطقة الجنوبية في سورية وتأثير ذلك كله على نشاط نطاطات الأوراق. أما في تركيا، فقد أظهرت نتائج اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي وجود فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط في عينات القمح والشعير المجموعة من منطقة وسط الأناضول وبنسبة ١٢.٧% من مجموع

العينات المنتقاة من هذه المنطقة، ولم تسجل أية إصابة بهذا الفيروس في منطقة بحر مرمرة، و بالتالي جاءت هذه النتيجة موافقة لما تم ذكره من قبل Mamluk وآخرون (١٩٩٧) وذلك بتسجيل فيروس اصفرار وموزاييك الشعير المخطط في منطقة وسط الأناضول (قونية وقرمان) وبنسبة إصابة أقل من ١%.

بينت الاختبارات المصلية وجود فيروس الموزاييك الشريطي للشعير في عينات الشعير المجموعة في سورية خلال الموسمين الزراعيين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و ٢٠٠٩/٢٠١٠ وبنسبة ١.٤% و ٣.٨%، على التوالي ودون أية إصابة على محصول القمح، الشوفان، والتريتيكالي. لوحظ عدم تركز الإصابة بهذا الفيروس في منطقة محدودة وقد يعود ذلك إلى أن الإصابة بهذا الفيروس تأتي غالباً من استخدام المزارعين بذار شعير مصاب من الموسم السابق وهذا ما يتوافق مع الدراسات المرجعية (مكوك وآخرون، ١٩٩٢)، حيث سبب هذا الفيروس خسارة في غلة الشعير في سورية قدرت بحوالي ٨.٦٦%. بينت نتائج الاختبارات المصلية في لبنان عدم وجود أي إصابة بفيروس الموزاييك الشريطي للشعير وجاء هذا مخالفاً للدراسات السابقة التي أكدت تسجيل هذا الفيروس على محصول الشعير في لبنان (Nienhaus & Saad, 1967). أما عن انتشار فيروس الموزاييك الشريطي للشعير في تركيا فقد أشارات نتائج الاختبار المصلي للعينات المجموعة من حقول القمح والشعير في تركيا إلى وجود فيروس الموزاييك الشريطي للشعير وبنسبة ٥.٥% من مجموع عينات الشعير المجموعة انتقائياً من حقول الشعير بمحافظة أنقرة، فيما لم تسجل أية إصابة في باقي المحافظات الممسوحة، وهذا لا يتوافق مع نتائج المسح الحقلي الذي أجراه Köklü (٢٠٠٤)، حيث وجد فيروس الموزاييك الشريطي للشعير في حقول الشعير في منطقة بحر مرمرة (محافظة تيكرداغ) وبنسبة وصلت حتى ٣.١%.

أما فيما يخص فيروس الموزاييك المخطط على القمح فقد أظهرت نتائج الاختبارات المصلية انتشاره في جميع مناطق المسح الحقلي في سورية ولكلا الموسمين الزراعيين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و ٢٠٠٩/٢٠١٠ على عينات القمح فقط وبنسبة إصابة ١.١%، ١.٩% من مجموع عينات القمح المجموعة لكلا الموسمين، على التوالي، وهذا يتوافق مع الدراسات المرجعية التي اشارت إلى تسجيل هذا الفيروس في سورية وعلى عينات القمح فقط (Makkouk & Kumari, 1997)، وبينت بعض الدراسات انتقال هذا الفيروس بواسطة البذور في سورية (عطار وقمري، ٢٠٠٩؛ الاسحاق، ٢٠١٠). وبالتالي فإنه حتى نسبة الإصابة المتدينة ربما تشكل مصدر وباء مع الزمن عند استخدام بذار ملوثة، لذلك يبرز هنا ضرورة استخدام بذار خالية من الإصابة للحد من انتشار هذا الفيروس. وفي لبنان سجلت إصابة واحدة فقط في حقول القمح

في منطقة الحلانية وهذا ما أكدته نتائج الاختبار المصلي/السيرولوجي وبنسبة إصابة ١.١% من مجموع عينات القمح المجموعة في لبنان مع العلم أنه قد تم تسجيل الفيروس في لبنان من قبل Nienhaus & Saed (١٩٦٧) وعلى عينات القمح أيضاً. تشير الدراسات المرجعية انتشارفيروس الموزاييك المخطط على القمح في تركيا وبنسبة إصابة أقل من ١% من مجموع عينات انتقائية في المسح الحقلي الذي جرى في منطقة وسط الأناضول للموسم الزراعي ١٩٩٥/١٩٩٦ (Mamluk *et al.*, 1997). ولتتطور النسبة وتصل حتى ١٠% من مجموع عينات القمح الانتقائية المجموعة في المسح الحقلي لمنطقة بحر مرمرة للموسم الزراعي ٢٠٠٣/٢٠٠٤ (Ilbagi *et al.*, 2005). بينت نتائج الاختبار المصلي للعينات المجموعة انتقائياً من حقول القمح والشعير في تركيا، أن نسبة الإصابة بفيروس الموزاييك المخطط على القمح بلغت ٤.٢% من مجموع عينات القمح، ولم يلاحظ اختلاف في نسبة الإصابة بين منطقة وسط الأناضول ومنطقة بحر مرمرة، فكان انتشار الفيروس متماثلاً في جميع المناطق دون التركيز في محافظة أو منطقة معينة.

أظهرت نتائج الاختبارات المصلية عدم تسجيل أية إصابة بفيروس تخطط الذرة في عينات القمح والشعير المجموعة في سورية والعينات للموسم الزراعي ٢٠٠٨/٢٠٠٩. وكشف هذا الاختبار عن وجود ثلاثة عينات قمح مصابة بفيروس تخطط الذرة في محافظة الحسكة وبنسبة إصابة ٠.٢% من مجموع عينات القمح للموسم ٢٠٠٩/٢٠١٠، وتعد هذه الإشارة الأولى لتسجيل فيروس تخطط الذرة في سورية وتحتاج النتائج لتأكيد بواسطة الاختبارات الجزيئية. كما كشفت نتائج الاختبارات المصلية عن وجود إصابة بفيروس تخطط الذرة في عينات القمح المجموعة في محافظتي أنقرة وأدرنة وبنسبة إصابة ٠.٣%.

بلغت نسبة الإصابة بفيروس تقزم القمح في سورية للموسم الزراعي 2٠٠٨/٢٠٠٩ حوالي ١.١% من مجموع عينات القمح والشعير المجموعة، وليزداد الانتشار وتتضاعف النسبة وتصل حتى ٢.٣% في الموسم ٢٠٠٩/٢٠١٠ في كلاً من المنطقتين الجنوبية والشرقية، وكانت عينات الشعير بالمجمل أكثر إصابة بفيروس تقزم القمح من عينات القمح. وتتشابه تلك النتيجة مع المسوحات الحقلية التي جرت في التشيك وتركيا وألمانيا (Mehner *et al*, 2003 ؛Kundu, 2009 ؛Köklü, 2004)، وكانت مخالفة لكثير من نتائج المسوحات الحقلية التي أُجريت في أوربا مثل السويد وهنغاريا وفرنسا (Lindbald & Sigvald, 2004 ؛Lindsten *et al.*, 1980 ؛Bendahmane *et al.*, 1995).

وبنظرة عامة على مجمل نسب الإصابة بالفيروسات المدروسة في موسم ٢٠٠٩/٢٠١٠ في سورية، نلاحظ تضاعف في نسبة الإصابة لأغلب هذه الفيروسات أو على الأقل زيادة في هذه النسبة لبعضها

الآخر، وبالتالي فإن تباين نسبة الإصابة بين الموسمين إنما مرده إلى الاختلاف في مواعيد جمع العينات الذي أثر بدوره في عمر النبات، درجة الحرارة، الرطوبة النسبية. والتي تلعب جميعها دوراً في تحديد موعد خروج الحشرة من طور السكون وبداية ظهور الأجيال الناقلة للفيروسات وتأثير هذه الظروف أيضاً على حركة ونشاط الناقل حيث يزداد نشاطه مع ارتفاع درجات الحرارة وزيادة سرعة الرياح وبالتالي يؤدي ذلك إلى ارتفاع في نسبة انتشار الفيروس وهذا ما أشارت إليه دراسات سابقة (A' Brook, 1981).

أما في تركيا فقد أكدت نتائج الاختبار المصلي وجود فيروس تقزم القمح في منطقة وسط الأناضول (قونية وقره مان) وبنسبة وصلت حتى ٣% من مجموع عينات القمح المجموعة، وهذه الإشارة الأولى لوجود الفيروس في تلك المنطقة حيث أكدت الدراسات المرجعية وجود فيروس تقزم القمح في منطقة بحر مرمرة (تكرداغ) (Köklü, 2004). واحتل فيروس تقزم القمح في هذه المنطقة المرتبة الثانية من حيث الانتشار بعد فيروس تقزم واصفرار الشعير-PAV (Köklü, 2004).

كما أظهرت نتائج الاختبارات المصلية أن نسبة العينات المصابة بأكثر من فيروس قليلة بالمقارنة مع العينات المصابة بفيروس واحد. ويمكن تفسير ذلك على أساس التخصصية في النقل للفيروسات المدروسة وخصوصاً الفيروسات التي تسبب نفس الأعراض، فعلى سبيل المثال تعتبر حشرات المنّ الناقل الرئيسي لفيروس تقزم واصفرار الشعير، بينما تعتبر نطاطات الأوراق من جنس *Psammotettix* هي الناقل الرئيس لفيروس تقزم القمح والذي يسبب أعراض مشابهة لأعراض فيروس تقزم واصفرار الشعير. فقد أكدت الدراسات أن أسلوب التعايش بين نطاطات الأوراق وحشرات المنّ معدوم، فوجود حشرات المنّ على النبات تؤدي إلى خلق بيئة غير مناسبة لنطاطات الأوراق (Alla *et al*., 2001).

بالإضافة لذلك، لم تتفاعل العديد من العينات التي ظهرت عليها أعراض إصابة مع أي من الأمصال المضادة المستخدمة في هذه الدراسة، وهذا يعود إلى احتمال أن تكون هذه النباتات مصابة بعامل ممرض آخر أدى إلى ظهور أعراض شبيهة بتلك المميزة للإصابة الفيروسية، أو نتيجة لتعرض النباتات لعوامل بيئية معينة (Wecbmar & Rybicki, 1985).

أكدت نتائج اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) ما تم التوصل إليه من نتائج بإختبار بصمة النسيج النباتي عند استخدام زوج البادئات المتخصصة بفيروس تقزم القمح، وهي عبارة عن منطقة من الجين تتضمن منطقة القراءة المفتوحة الثانية ORF2 التي تشفر بروتين التضاعف الفيروسي. أكدت

الدراسات استخدام العديد من البادئات في الكشف عن فيروس تقزم القمح وبأحجام مختلفة (Kvarnheden *et al*., 2002). حتى أنه ذكرت المراجع وجود بادئات تستطيع التمييز بين سلالتين الفيروس (سلالة الشعير، سلالة القمح) (Ramsell, 2007)، ولم تستخدم تلك البادئات في هذا البحث. لكن تعتبر شجرة القرابة الوراثية كافية لتأكيد وجود سلالتين للفيروس في سورية، حيث بيت نتائج دراسة تتالي نيوكليوتيدات الحمض النووي الفيروسي للعزلتين السوريتين SB 1248-09 المعزولة من نبات الشعير والعزلة SW 2131-09 المعزولة من نبات القمح، ومن ثم عملية مقارنة التتابعات النكليوتيدية التي تم الحصول عليها للعزلتين السوريتين المذكورتين مع التتابعات النكليوتيدية لعزلات من نفس الفيروس موجودة في الموقع الالكتروني للبنك الوراثي (NCBI) وباستخدام برنامج البحث عن الاصطفاف في قاعدة البيانات (Blast). حيث تبين تشابه العزلة السورية SB1248-09 مع العزلة الايرانية (FJ 620684.1) وبنسبة ٩٩% (Behjatnia *et al*., 2011) فيما تشابهت العزلة السورية SW 2131-09 مع العزلة الفرنسية بنسبة ١٠٠% (Bendahmane *et al*., 1995)، بينما كانت نسبة التشابه مع بقية العزلات الأوربية المدروسة بنسبة ٩٨-٩٩% الأمر الذي أكد دقة هذا التشخيص.

ولم يكن النطاط *P. alienus* هو الناقل الوحيد لفيروس تقزم القمح خلافاً لما تم ذكره من قبل Vacke (1961) و Lindsten وآخرون (1980). فقد بينت نتائج هذا البحث إمكانية نقل العزلة السورية من فيروس تقزم القمح بواسطة نطاط الأوراق *P. provincialis* بكفاءة عالية على نباتات الشعير ولم تلاحظ أية كفاءة لهذا النطاط في نقل العزلة السورية SB 1248-09 على نباتات القمح، وهذا يتوافق مع بعض الدراسات التي أكدت عدم إمكانية نقل العزلة التي تصيب القمح إلى الشعير وبالعكس (Lindsten &Vacke, 1991). بينما أكدت بعض الدراسات إمكانية نقل سلالة الشعير أو سلالة القمح من فيروس تقزم القمح إلى نباتات قمح أو الشعير وبالعكس (Schubert *et al*., 2007). كانت نسبة التشابه بناءً على نتائج شجرة القرابة الوراثية بين السلالتين ٨٦%، وهذا موافق لما تم ذكره من قبل Schuberet وآخرون (٢٠٠٧) و Köklü (٢٠٠٧) وآخرون، حيث لوحظ عند دراسة تتالي القواعد الأزوتية لكلا السلالتين وجود تطابق بين السلالتين بنسبة ٨٣-٨٤%.

كما تم الحصول في هذه الدراسة على مادة فيروسية نقية للعزلة السورية SB1248-09 لفيروس تقزم القمح حيث تراوحت كمية الفيروس النقي ٢.٦٦-٢.٧٦ ميكروغرام من الكيلوغرام الواحد من النسيج المصاب وهي كمية قريبة من الكمية (٢.١ ميكروغرام) التي تم الحصول عليها في دراسة سابقة أجربت لهذا الفيروس (Lindsten *et al.,* 1980). كانت الإجراءات المتبعة في عملية الاستخلاص والتنقية مشابهة للطريقة المتبعة من قبل Lindsten وآخرون (١٩٨٠) مع إجراء بعض التعديلات مناسبة للحصول على كمية جيدة من الفيروس النقي وبالتالي يمكن اعتمادها في عمليات الاستخلاص

والتنقية لعزلات مختلفة من فيروس تقزم القمح. لم يستطيع المصل متعدد الكلون المنتج في هذه الدراسة التفريق بين سلالتي الفيروس حاله حال المصل المنتج من قبل Lindsten وآخرون (١٩٨٠). وحديثاً أكدت الدراسات إمكانية إنتاج مصل وحيد الكلون قادر على التفريق بين سلالتي الفيروس (Schubert *et al.*, 2007). أما فيما يتعلق بالمادة الفيروسية التي تم تنقيتها للعزلة SB 1248-09 فقد تراوحت نسبة قراءتها عند موجة طولها ٢٦٠ الى تلك عند موجة طولها ٢٨٠ نانومتراً بين ١.٢٢–١.٧٢، وهذه القراءات قريبة من القراءات المعروفة لأحد أفراد العائلة *Geminiviridae* الذي يتبعها فيروس تقزم القمح حيث ذكر بأن هذه القراءات تراوحت بين ١.٢١–١.٦٦ (Francki *et al.*, 1979).

تطابقت النتائج المتحصل عليها من دراسة المدى العائلي لفيروس تقزم القمح (العزلة SB1248-09) على أهم المحاصيل النجيلية مع نتائج الدراسات السابقة من حيث حساسية كل من الشعير والشوفان للإصابة بفيروس تقزم القمح (Arenö, 1998؛ Lindsten *et al*, 1980؛ Vacke, 1961).

الاستنتاجات

١. أظهرت نتائج المسح الحقلي الذي أجري خلال الموسمين الزراعين ٢٠٠٨/٢٠٠٩ و٢٠٠٩/٢٠١٠ على محصولي القمح والشعير في سورية، تركيا ولبنان أن فيروس تقزم واصفرار الشعير كان أكثر الفيروسات انتشاراً ضمن العينات المختبرة.

٢. جاء فيروس تقزم القمح في المرتبة الثالثة في كل من سورية وتركيا وتلاه فيروس الموزاييك المخطط للقمح، وفيروس الموزاييك الشريطي للشعير. في حين كان فيروس تخطط الذرة أقل الفيروسات انتشاراً.

٣. سجلت الإصابة الطبيعية بفيروس تقزم القمح لأول مرة في سورية، على محصولي القمح والشعير، وتم التأكد من وجود الفيروس وتوصيفه بواسطة الإختبارات المصلية والبيولوجيا الجزيئية والنقل الحشري.

٤. أظهرت النتائج زيادة نسبة الإصابة بالفيروسات في الموسم الثاني (٢٠٠٩/٢٠١٠) عنه في الموسم الأول في سورية. يمكن أن يعزى ذلك إلى التأخر في جمع العينات من نيسان (موسم أول) إلى أيار (موسم ثاني)، الذي أدى إلى زيادة في النشاط الحشري.

٥. أمكن نقل العزلة السورية (SB 1248-09) لفيروس تقزم القمح والمعزولة من نبات شعير بواسطة النطاطات من النوع *Psammotettix provincialis* (Ribaut) بنسبة وصلت حتى ٩٥%، فيما لم يفلح في نقل العزلة SW 2131-09 لنفس الفيروس والمعزولة من نبات قمح، ويعد هذا هو التسجيل الأول لهذا النوع من النطاطات في نقل هذا الفيروس على مستوى سورية والعالم.

٦. أصيبت طرز وراثية مختلفة من الشوفان والشعير مجموعة من أماكن عدة من العالم بالعزلة السورية SB 1248-09 من فيروس تقزم القمح، حيث وصلت نسبة الإصابة إلى ٩٠% و٩٥%، على التوالي، وباستخدام الناقل *P. provincialis*.

٧. بينت دراسة التتالي النكليوتيدي لكلا العزلتين السوريتين SB 1248-09 و SW2131-09 أن نسبة التشابه بلغت ٨٦%.

٨. تم إنتاج مصل مضاد متعدد الكلون ضد العزلة السورية SB 1248-09 لفيروس تقزم القمح، ذو نوعية جيدة و قدرة عالية على الكشف عن الفيروس باختبار بصمة النسيج النباتي المناعي.

٩. أظهرت شجرة القرابة الوراثية انقسام عزلات فيروس تقزم القمح إلى مجموعتين منفصلتين، ضمت المجموعة الأولى عزلات الفيروس العالمية المعزولة من نباتات قمح بما فيها العزلة السورية SW 2131-09 المعزولة من القمح، في حين ضمت المجموعة الثانية العزلات الفيروسية العالمية المعزولة من نباتات شعير بما فيها العزلة السورية SB 1248-09 المعزولة من نبات شعير. مما يفسر وجود سلالتين لهذا الفيروس في سورية.

التوصيات والمقترحات

١. تكرار إجراء المسح الحقلي لعدة مواسم ذات ظروف مناخية مختلفة، ليشمل معظم حقول القمح والشعير في مناطق زراعتها في سورية بإضافة إلى الأعشاب المرافقة والمجاورة لهذه الحقول، والتركيز على معرفة نسب انتشار فيروس تقزم القمح في حقول القمح والشعير في سورية من خلال أخذ عينات عشوائية.

٢. دراسة دورة حياة فيروس تقزم القمح في الحقول السورية من خلال معرفة العوائل المناوبة، وتتبع نشاط النواقل الحيوية.

٣. البحث (في حال وجوده) عن نواقل حيوية أخرى لفيروس تقزم القمح، موجودة في أماكن الإصابة.

٤. دراسة الاختلافات بين سلالتي فيروس تقزم القمح عن طريق إنتاج أمصال مضادة وحيدة الكلون جديدة قادرة على التفريق بين سلالتي فيروس تقزم القمح، أو عن طريق الاختبارات البيولوجية والجزيئية.

٥. ينصح بوضع مخطط لمكافحة حشرات النطاطات في حقول القمح والشعير للتقليل من الإصابة بفيروس تقزم القمح وذلك لتفادي الإصابة الوبائية في المواسم الزراعية التي تتميز بظروف مناخية مواتية لنشاط الناقل الحيوي، وبالتالي الإصابة الفيروسية العالية.

٦. غربلة أصناف من القمح والشعير لفيروس تقزم القمح تحت الظروف الطبيعية السورية.

ملحق ١

اختبار بصمة النسيج النباتي المناعي (Tissue blot immunoassay TBIA)

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل مكّوك و قمري (١٩٩٦) لإجراء هذا الاختبار، وتتلخص خطواته بمايلي:

١. قطع الجزء النباتي المراد فحصه (ورقة، عنق الورقة، ساق، جذر) باستخدام شفرة خاصة بالقطع، ثم طبع الجزء النباتي على غشاء السيليلوز المنترت (Nitrocellulose Membrane; NCM) ذي ثقوب 0.45 ميكرومتر ومن إنتاج شركة Schleicher & Schuell (ألمانيا).

٢. غسل غشاء السيليلوز المنترت ي ثلاث مرّات باستخدام محلول ملحي فوسفاتي منظّم Phosphate Buffer Saline –Tween20 (PBST)، وبفاصل زمني قدره خمس دقائق بين كل غسيل وآخر.

٣. وضع غشاء السيليلوز المنترت المطبوع في محلول التغطية وهو بولي فينيل الكحول Polyvinyl Alcohol (PVA) المذاب في محلول الغسيل PBST بتركيز ٠.١ مغ/مل ولمدة دقيقة واحدة، هدفت هذه العملية إلى تغطية الثقوب والمناطق غير المتفاعلة في الغشاء النيتروسيلليلوز ي.

٤. غسل الغشاء بالــ PBST كما ورد في الخطوة ٢ تماماً.

٥. وضع الغشاء إما في محلول الأجسام المضادة وحيدة الكلون المنتجة في الفئران والمددة إلى التركيز المناسب في محلول الربط (Conjugate buffer) أو في محلول الأجسام المضادة متعددة الكلون المنتجة في الأرانب والمددة إلى التركيز المناسب في محلول PBST، وترك لمدة ساعة على رجّاج آلي عند درجة حرارة المخبر.

٦. غسل الغشاء كما ورد في الخطوة ٢.

٧. وضع الغشاء إما في محلول الأجسام المضادة متعددة الكلون المنتجة في جسم الماعز ضد الأجسام المضادة للفئران والمرتبطة بانزيم الفوسفات القلوي Goat-Anti mouse IgG (whole molecule) – Alkaline Phosphatase (إنتاج شركة Sigma)، أو الأجسام المضادة متعددة الكلون المنتجة في جسم الماعز ضد الأجسام المضادة للأرانب والمرتبطة بانزيم الفوسفات القلوي Goat-Anti rabbit IgG (whole molecule) –Alkaline Phosphatase (إنتاج شركة Sigma) وذلك حسب الجسم المضاد المستخدم في الخطوة رقم ٥، وترك لمدة ساعة مع رج خفيف عند درجة حرارة المخبر.

٨. غسل الغشاء كما ورد في الخطوة ٢.

٩. وضع الغشاء في محلول مادة التفاعل (ركيزة الانزيم) Substrate Buffer والمكوّن من 3.5 مغ من Nitroblue Tetrazolium (NBT) و1.8 مغ من 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BICP) المذابة في10 مل من محلول Tris-HCl ذي العياريّة 0.1 مولر ودرجة الحموضة 9.5 والمحتوي على 0.1 مولر من كلوريد الصوديوم و0.5 مولر من كلوريد المغنزيوم MgCl2، يقوم الانزيم المرتبط مع الأجسام المضادة بتفكيك ركيز الانزيم خلال دقائق.

١٠. غسل الغشاء بالماء المقطر ومن ثم قراءة التفاعل بالعين المجرّدة أو باستخدام المكبّرة، حيث تتلون الأنسجة المصابة باللون الأرجواني بينما تنقى الأنسجة السليمة بدون تلوّن.

ملحق ٢

خطوات استخلاص الحمض النووي الريبي الكلي DNA من أنسجة النبات

باستخدام مجموعة اختبار خاصة DNeasy® Plant Mini Kit (رقم 69104) المنتجة في شركة Qiagen (Heldin، Germany) وبإتباع الطريقة الموصوفة من قبل Mackenzie وآخرون (١٩٩٧).

١. تم طحن ٠.٢ مغ من النسيج النباتي المجفف للعينة المصابة بواسطة الآزوت السائل، ثم نقلت العينة إلى أنبوب سعته ٢ مل.

٢. أضيف لكل عينة ٢ مل من محلول الاستخلاص RB، وأخضع الأنبوب لطرد مركزي عند سرعة منخفضة (≈ ٨٠٠٠ دورة/ د) لمدة دقيقتين.

٣. أخذ حوالي ٩٠٠ ميكروليتر من الرائق (الطبقة العلوية) الناتج في الخطوة السابقة، ونقلت إلى أنبوب إيندورف Eppendorf جديد (سعة ١.٥ مل).

٤. أضيف إلى الأنبوب (خطوة ٣) ١٠٠ ميكروليتر من محلول ساركوسيل (Sarkosyl) تركيزه ٢٠% و١٠ ميكروليتر من محلول مركبتوإيتانول (β-Mercabtoethanol)، وتمّ خلط المزيج جيداً بهزّ الأنبوب عدّة مرات بواسطة اليد، أو بواسطة هزاز كهربائي.

ملاحظة: في هذه المرحلة يمكن حفظ العينات لمدّة أسبوع واحد عند درجة حرارة −٢٠ سْ، أو ليوم واحد عند درجة حرارة ٠ ^{o}س، في حال الضرورة.

٥. تمّ تحضين الأنبوب (خطوة ٤) لمدّة ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٧٠ ^{o}س ضمن حمام مائي. مع ضرورة هزّ الأنبوب عند منتصف تلك الفترة (بعد ٥ دقائق).

٦. نُقل ٧٠٠ ميكروليتر من الرائق الشفاف (خطوة ٥) إلى أنبوب إيندورف جديد، وأضيف لها ٣٠٠ ميكروليتر من الإيتانول البارد (تركيزه ١٠٠%)، مع خلط المزيج جيداً بواسطة الماصة الإلكترونية Pipette.

ملاحظة: في هذه المرحلة يمكن حفظ العينات لمدّة أسبوع واحد عند درجة حرارة −٢٠ ^{o}س، أو ليوم واحد عند درجة حرارة ٠ ^{o}س، في حال الضرورة.

٧. نُقل ٦٥٠ ميكروليتر من العينة (خطوة ٦) إلى عمود الاستخلاص (ذو اللون الزهري) Pink Extraction Column ضمن أنبوب سعة ٢ مل. واخضع لطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة ١٣٠٠٠/١٤٠٠٠ دورة /دقيقة.

٨. تم التخلص من السائل الراشح، ونُقل عمود الاستخلاص إلى أنبوب جديد.

٩. تم إضافة ٥٠٠ ميكروليتر من محلول الغسيل الأول RW1 إلى عمود الاستخلاص. واخضع الأنبوب إلى طرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة ١٣٠٠٠/١٤٠٠٠ دورة /دقيقة. ثم تخلّصنا من الرشاحة الناتجة.

١٠. أعيد إضافة ٥٠٠ ميكروليتر من محلول الغسيل الثاني RPE إلى عمود الاستخلاص. واخضع الأنبوب إلى طرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة ١٣٠٠٠/١٤٠٠٠ دورة /دقيقة. مع التخلص من الرشاحة الناتجة.

ملاحظة: يمكن إعادة الخطوتين الأخيرتين (٩ و١٠) في حال كون الرشاحة غير شفافة (ملونة).

١١. اخضع الأنبوب لطرد مركزي لمدة دقيقتين على سرعة ١٤٠٠٠ دورة/دقيقة للتخلص من محلول الغسيل.

١٢. نُقل عمود الاستخلاص إلى أنبوب إبندورف جديد (سعة ١.٥ مل)، وأضيف ٥٠ ميكروليتر من محلول خالي من أنزيم تحليل الــ DNA (DNA Elution Buffur) إلى مركز عمود الاستخلاص، وبعد مرور حوالي ٢–٣ دقائق (عند درجة حرارة المختبر) أجري للأنبوب عملية طرد مركزي لمدة ٢ دقيقة للحصول على DNA النقي.

ملاحظة: يمكن استخدام الماء المقطر والمعقم الخالي من إنزيم تحليل DNA (DNAeas Free Water) لحلّ الحمض النووي الريبي المنقوص الأوكسجين المتحصل عليه.

١٣. حفظ الــ DNA في المجمدة عند درجة حرارة –٢٠ ^{o}س لاستخدامه في الاختبارات المتلاحقة. (ويجب حفظه عند درجة حرارة –٨٠ ^{o}س للفترات الطويلة).

ملحق ٣

المحاليل المستخدمة في اختبار التفاعل المتسلسل للبوليميراز
Polymerase Chain Reaction PCR

محلول التحميل Loading dye buffer:

١-Glyserol.. 2 مل

٢-DH2O.. 3 مل

٣-EDTA.. 0.11 غ وتعدّل الحموضة pH=8.0

٤-Bromophenol blue.............................. 0.01 غ

المحلول المنظم (TBE (Tris Borate EDTA buffer:

تم تحضير لتر (١٠×) كمحلول أساسي وتم الحصول على التخفيف المطلوب منه:

١- Tris-base.. 107.8غ

٢- Boric Acid...................................... 55 غ

٣- EDTA.. 7.44 غ

٤- DH2O.. ١ ليتر وتعدّل الحموضة pH=8.3

محلول الصبغ Staining Reagent:

نحتاج 0.5 ميكروليتر لكل1 مل ماء مقطر أي تم تحضير لتر واحد من محلول الصبغ بإضافة 0.5 مل من بروميد الإيثيديوم إلى لتر واحد من الماء المقطر.

ملحق 4
عزل وتنقية فيروس تقزم القمح

تمت تنقية فيروس تقزم القمح من المجموع الخضري (أوراق وسوق) لنباتات شعير معدية بالعزلة السورية، حصدت النباتات المصابة بعد ٣٠ يوم من العدوى. استخدمت النباتات المعداة في عملية عزل الفيروس وتنقيته، وذلك بإتباع الخطوات الموصوفة سابقاً (Lindsten *et al*., 1980) مع إجراء بعض التعديلات وفق ما يلي:

١. طحن النسيج النباتي المصاب (المحفوظ على درجة حرارة −٢٠ ^{o}س على شكل بودرة بعد طحنه باستخدام Liquid nitrogen) بمحلول منظم من فوسفات البوتاسيوم ($K2HPO_4$) عياريته ٠.٠١ مولر ودرجة حموضته ٤ والمحتوي على:
   - ٠.٠١ مولر من EDTA (Ethylene diaminetetra acetic acid)
   - ٠.١% TGA (Thioglycollic acid)

   وذلك بمعدل ٥ مل لكل ١ غرام من الأنسجة المصابة.
٢. ترك المستحضر السابق لمدة ٣٠ دقيقة مع التحريك المستمر عند درجة حرارة الغرفة.
٣. صفي المستحضر بواسطة قطعة شاش وأخذ الرشح.
٤. أخضع الراشح لطرد مركزي خفيف بسرعة ١٥,٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٥ دقيقة باستخدام جهاز الطرد المركزي من النوع Sorvall والرأس الدوار GS-3 للتخلص من جميع المواد المترسبة (غير الذائبة) وخاصة صبغة الكلورفيل وتم جمع الرائق.
٥. ركز الفيروس في الرائق السابق مرة أخرى، بواسطة الطرد المركزي فائق السرعة ٣٥,٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٢٠ دقيقة، وباستعمال جهاز الطرد المركزي فائق السرعة من النوع Beckman والرأس الدوار TY-35، ثم جمع الراسب.
٦. ذوب الراسب في محلول KPO_4 عياريته ٠.٠١ مولر ودرجة حموضته ٧، وبمعدل ١ مل من المحلول لكل ١٠ غرام من وزن النباتات المستخدمة، وترك عند درجة حراراة ٤ ^{o}س لمدة ١٦ ساعة مع التحريك.
٧. أخضع المعلق الناتج عن الخطوة السابقة لطرد مركزي خفيف باستخدام جهاز Eppendorf (مزود بمبرد) بسرعة ١٣,٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٠ دقائق، للتخلص من المواد غير الذائبة وأخذ الرائق.
٨. وضع المستخلص النهائي الحاوي على الفيروس (الرائق) في أنابيب ذو تراكيز متدرجة من السكروز بلغت من القمة للقاعدة ١٠−٤٠% (ذوب السكروز بمحلول KPO_4 عياريته ٠.٠١ مولر ودرجة حموضته ٧) يحوي كل منها على ١٠ مل بمعدل ١ مل من المستخلص السابق لكل الإنبوب (يوضع المستخلص على الطبقة السطحية بهدوء وحذر)، ثم أجري طرد مركزي فائق السرعة ٣٥,٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٠٠ دقيقة باستعمال جهاز الطرد المركزي فائق السرعة من نوع Beckman والرأس الدوار SW-41.

٩. فصل شريط الفيروس النقي باستخدام جهاز فصل (Density Gradient Fractionator ISCO) باستعمال موجة طولها ٢٥٤ نانومتراً.

١٠. جمع الشريط الحاوي على الفيروس، وتم تمديده عشر مرات بمحلول KPO_4 عياريته ٠.٠١ مولر ودرجة حموضته ٧، ثم أخضع لطرد مركزي فائق السرعة من النوع Beckman والرأس الدوار SW-28.

١١. أهمل الرائق، وذوب الراسب في ٢ مل محلول KPO_4 عياريته ٠.٠١ مولر ودرجة حموضته ٧، لكل أنبوب.

١٢. أخضع المعلق الناتج عن الخطوة السابقة لطرد مركزي خفيف باستخدام جهاز Eppendorf (مزود بمبرد) بسرعة ١٣,٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٠ دقائق، للتخلص من المواد غير الذائبة، وأخذ الرائق.

١٣. وضع المستخلص النهائي الحاوي على الفيروس (الرائق) في أنابيب ذو تراكيز متدرجة من السكروز بلغت من القمة للقاعدة ١٠-٤٠% (ذوب السكروز بمحلول KPO_4 عياريته ٠.٠١ مولر ودرجة حموضته ٧) يحوي كل منها على ١٠ مل، بمعدل ١ مل من المستخلص السابق لكل الإنبوب (يوضع المستخلص على الطبقة السطحية بهدوء وحذر)، ثم أجري طرد مركزي فائق السرعة ٣٥,٠٠٠ دورة بالدقيقة ولمدة ١٠٠ دقيقة باستعمال جهاز الطرد المركزي فائق السرعة من نوع Beckman والرأس الدوار SW-41.

١٤. فصل شريط الفيروس النقي باستخدام جهاز فصل (Density Gradient Fractionator ISCO) باستعمال موجة طولها ٢٥٤ نانومتراً، ثم حفظه عند درجة حرارة -٢٠ ^{o}س لحين حقنه بالأرنب.

ملحق 5
المحاليل المستخدمة في الاختبارات المصلية

١. المحلول المنظم الفوسفاتي الملحي Phosphate Buffer Saline PBS:

لتحضير لتر واحد منه أذيب ٨ غ من كلوريد الصوديوم (NaCl) و٠.٧٥٧ غ فوسفات الصوديوم اللامائية (Na_2HPO_4) و٠.٢ غ كلوريد البوتاسيوم (KCl) و٠.٢ غ أزيد الصوديوم (NaN_3) في لتر من الماء المقطر ثم ضبطت درجة الحموضة على ٧.٤.

٢. محلول الغسيل Phosphate Buffer Saline-Tween PBST:

أضيف ٠.٥ مل من مادة Tween-20 إلى لتر من المحلول المنظم الفوسفاتي الملحي PBS.

٣. محلول الربط Conjugate Buffer:

تم تحضير لتر واحد من محلول الربط بإذابة ٢٠ غ من مادة Polyvenylpyrrolydone PVP و٢ غ من مادة Ovalbumin في لتر واحد من محلول الغسيل PBST.

٤. محلول ركيز الانزيم Substrate Buffer:

تم تحضير لتر واحد من هذا المحلول بمزج ٩٧ مل من Diethanolamine مع ٨٠٠ مل ماء مقطر ثم أذيب فيها ٠.٢ غ أزيد الصوديوم (NaN_3) ثم ضبطت درجة الحموضة على ٩.٨ وأكمل الحجم إلى لتر.

٥. محلول التغطية Coating Buffer:

تم تحضير لتر واحد من محلول التغطية بإذابة ١.٥٩غ من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) و٢.٩٣ غ بيكربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) و٠.٢ غ أزيد الصوديوم (NaN_3) في لتر من الماء المقطر ثم ضبطت درجة الحموضة على ٩.٦.

ملحق ٦

فصل قطعة الحمض النووي المكاثرة من هلامة الأغاروز، وتنقيتها

باستخدام مجموعة محاليل استخلاص QIAquick Gel Extraction Kit (رقم ٢٨٧٠٤) من إنتاج شركة Qiagen (USA ،Maryland) تبعاً لتعليمات الشركة الصانعة:

١. فصلت جزيئات الـــ DNA من هلام الأغاروز باستخدام شفرة حادة ومعقمة وبوجود الأشعة فوق البنفسجية (UV) Ultraviolet. وتم وزن القطعة المفصولة باستخدام جهاز حساس.

٢. تم إضافة المحلول المنظم QG إلى القطعة المفصولة من هلام الأغاروز بنسبة ٣ : ١ (حجم: وزن).

٣. حضن الأنبوب عند درجة حرارة ٥٠ °س لمدة ١٠ دقائق في حمام مائي وحرك الأنبوب كل ٢–٣ دقائق حتى يذوب كامل محتوى الأنبوب.

ملاحظة: بعد ذوبان هلام الأغاروز تأكد من لون السائل فإذا كان أصفر فهو المطلوب، أما إذا كان لونه برتقالي أو بنفسجي أضف حوالي ١٠ ميكروليتر من محلول Sodium acetate (3M) درجة حموضته PH= 5، عندها سيتغير اللون إلى الأصفر.

٤. نقلت محتويات الأنبوب إلى أنبوب كبير وتم إضافة ايزوبروبانول بنسبة ١:١، ثم حرك الأنبوب مرة واحدة فقط رأساً على عقب.

٥. صبت محتويات الأنبوب (الخطوة السابقة) في عمود التثفيل QIAquick spin column المرتبط بأنبوب جمع سعته ٢ مل، ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة ٢ دقيقة على سرعة ١٤٠٠٠ دورة في الدقيقة، وأهمل الرائق.

٦. تم إضافة ٠.٥ مل من المحلول المنظم QG إلى العمود السابق QIAquick column ثم أُخضع لطرد مركزي لمدة ١ دقيقة على سرعة ١٤٠٠٠ دورة في الدقيقة.

٧. تمت عملية الغسيل بإضافة ٧٥٠ ميكروليتر من المحلول المنظم PE إلى العمود السابق QIAquick column، تركت لمدة خمس دقائق ثم أُخضعت لطرد مركزي لمدة ١ دقيقة على سرعة ١٤٠٠٠ دورة في الدقيقة، وأهمل الرائق.

٨. أخضع لطرد المركزي لمدة ١ دقيقة بسرعة ١٤٠٠٠ دورة في الدقيقة، وأهمل الرائق، للتخلص من بقايا الإيثانول. ثم نقل العمود إلى أنبوب سعته ١.٥ مل.

٩. أضيف ٥٠ ميكروليتر من المحلول المنظم EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) أو الماء إلى مركز العمود السابق QIAquick column وبهدوء شديد وتركت لمدة ٢ دقيقة ثم أخضعت لطرد مركزي لمدة ٢ دقيقة على سرعة ١٤٠٠٠ دورة في الدقيقة.

الملخص باللغة الانكليزية

Distribution and characterization of *Wheat dwarf virus* in Syria and some neighboring countries

Field survey was conducted in Syria during the 2008/2009 growing season, to identify viruses which affect wheat and barley crops. Leaf samples from plants with typical symptoms of viral infection (dwarfing, yellowing, stripping, reddening and stunting) were collected. Serological tests (tissue blot immunoassay) indicated that BYDV–PAV was the most commonly encountered virus (20%) followed by BYSMV (1,2%), WDV(1,1%), BSMV(0,6%) and WSMV (0,5%), whereas MSV was not detected. In host range and transmission studies of a Syrian isolate of WDV, the leafhopper species *Psammotettix provincialis* Ribaut (Homoptera: Cicadellidae) (identified by British Museum, UK), was able to transmit two Syrian barley WDV isolates (SB 1248-09 and SB 1249-09) from infected barley plants to barley (95% of the inoculated plants became infected) and *A. sativa* (90%) under greenhouse conditions. PCR assay of six WDV-positive samples (three wheat and three barley) revealed that all six samples produced an amplicon around the expected size (~253 bp). Sequence analysis of the amplicons from two isolates [SW 2131-09 isolated from wheat (GenBank Accession No. HQ113095) and SB 1248-09 isolated from barley (GenBank Accession No. HQ113096)] showed that they were 86% similar to each other. Comparing the sequence of barley isolate amplicon (SB 1248-09) to other WDV isolates showed a 99% similarity to Iranian isolate of *Barley dwarf virus* (FJ620684.1) and 92% similarity to barley European WDV isolates, whereas, the wheat isolate (SW 2131-09) showed a 98-100% similarity to most wheat European WDV isolates. To our knowledge, this is the first record of WDV infecting wheat and barley crops in Syria, and the first report of *P. provincialis* as WDV vector worldwide. *Wheat dwarf virus* particles were isolated snd purified, an amount of microgram of purified virions were ontaind from each kilogram of infected barley tissue. Also, a very distinguishing polyclonal antiserum to *wheat dwarf virus* was produced, and the antiserum was evaluated for sensitivity and specificity by TBIA, the resut showed the ability antiserum produced to detect *Wheat dwarf virus* efficiently with a clear reaction and no background at a titer of 1:1000 and the capability of detection kept until the titer of 1:٢٥٦000.

قائمة المراجع :

1. **الاسحاق، الياس. ٢٠١٠**. دراسة تأثير فيروس الموزاييك المخطط للقمح في إنتاجية محصول القمح وإمكانية انتقاله بالبذور. أطروحة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البعث، حمص، سورية. ٥٨ صفحة.

2. **الزراعة في لبنان. ٢٠٠٥**. وزارة الزراعة اللبنانية، مديرية الدراسات والتنسيق، مشروع الإحصاء الزراعي الشامل، ٥٨ صفحة.

3. **العنسي، عادل، صفاء قمري، أمين عامر حاج قاسم، خالد مكوك وإسماعيل محرم. ٢٠٠٧.** تقصي إنتشار فيروسات تقزم واصفرار الشعير على محاصيل الحبوب والأعشاب النجيلية في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، ٢٥: ١-٩.

4. **المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، ٢٠٠٩**. وزارة الزراعة، مديرية الإحصاء والتخطيط، سورية، ١٣٨ صفحة.

5. **سكاف، جهاد، خالد مكوك، فواز العظمة ووجيه قسيس. ١٩٨٨**. فيروس تقزم واصفرار الشعير: انتقاله بحشرات المنّ وانتشاره على محاصيل الحبوب النجيلية في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، ٦: ٩٧-١٠٥.

6. **شحادة، علي. ٢٠٠٣**. واقع إنتاج المحاصيل الحقلية في سورية. ندوة وسائل التحسين الوراثي للمحاصيل الحقلية والثروة الحيوانية. مطبوعات المجلس الأعلى للعلوم-سورية، الصفحات: ١٣٩-١٦٥

7. **عطار، نوران وصفاء قمري. ٢٠٠٩**. التوصيف الجزيئي لعزلة سورية من فيروس الموزاييك للقمح (WSMV) وامكانية انتقالها بواسطة حبوب اللقاح. مجلة وقاية النبات العربية، ٢٧، عدد خاص، صفحة A-91.

8. **كعكة، نوال. ١٩٨٨**. مورفولوجيا وتصنيف الحشرات، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية- جامعة حلب. ٣١١ صفحة.

9. **كيال، حامد محمد. ١٩٨٨**. إنتاج محاصيل الحبوب والبقول، مطبعة طربين، دمشق- سورية، ٣٣٥ صفحة.

10. **مكوك، خالد محي الدين وصفاء قمري. ١٩٩٦.** الكشف عن عشرة فيروسات تصيب المحاصيل البقولية بالاختبار المصلي لبصمة النسيج النباتي. مجلة وقاية النبات العربية، ١٤: ٣-٩.

11. **مكوك، خالد محي الدين، جابر فجلة و صفاء قمري. ٢٠٠٨.** الأمراض الفيروسية للمحاصيل الزراعية في المنطقة العربية. إصدار الجمعية العربية لوقاية النبات، دار النهضة العربية، ٦٣١ صفحة.

12. **مكوك، خالد محي الدين، وليد رضوان وأمين حاج قاسم. ١٩٩٢.** حصر الفيروسات الموجودة في بذور الشعير والعدس والفول في سورية. مجلة وقاية النبات العربية. ١٠: ٣-٨

13. **منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة. (FAO). ٢٠٠٩.** الإحصاء الزراعي، الموقع الإلكتروني /http:// www.FAO.org

14. **A'Brook, J. 1981.** Some observation in west wales on the relationships between numbers of a late aphids and weather . *Annals of Applied Biology* 97: 11-15.

15. **Achon, M.A., L. Serrano, C. Ratti, and C. Rubies-Autonell, 2006.** First detection of Wheat dwarf virus in barley in Spain associated with an outbreak of Barley yellow dwarf. *Plant Disease*: 90, 970.

16. **Agrios, G. N. 1997.** Plant Pathology. Academic press limited.London.547-554

17. **Ahmad, S., M.E. Mackay and G.J. Blomquist, 1989.** Accumulation of female sex Pheromones and its transfer to and metabolism in the male housefly, (Musca domestica L.) during courtship and mating. J.*Insect Physioogyl*., 35: 775–80.

18. **Alison, D., and K.S. Pike. 1988.** An inexpensive suction trap and its use in an aphid monitoring network. *J. Agriculture Enomologyt*. 5, 103- 107.

19. **Alla, S., J.P. Moreau, and B. Frerot. 2001.** Effects of the aphid *Rhopalosiphum padi* on the leafhopper Psammotettix alienus under laboratory conditions. - *Entomologia Expremint*. Appl. 98(2): 203-209.

20. **Alverson, D.R., and R.W. Matthews. 1987.** Response of leafhopper and aphids to variously colored sticky traps. J. Georgia *Enomology Socity*. 12, 336-341.

21. **Ammar, E.D., and L.R. Nault. 1991.** Maize chlorotic dwarf v*irus* like particles associated with the foregut in vector and non vector leafhopper species. *Phytopathology* 81, 444– 448..
22. **Ammar, E.D., R.G. Gomez-Luengo, D.T. Gordon, and S.A. Hogenhout. 2005.** Characterization of Maize Iranian mosaic virus and comparison with Hawaiian and other isolates of Maize mosaic virus (Rhabdoviridae). J. *Phytopathology* 153:129-136
23. **Arenö, P. 1999**. Wheat dwarf virus and Psammotettix alienus in grassland vegetation.PhD thesis, SLU Institution. 20 .
24. **Bakardjieva, N., C. Krasteva, A. Habekuss, and F. Rabenstein. 2004.** Detection of cerealviruses and study of aphid population in Bulgaria. Bulgarian *journal of agricultural sciences* 10, 161-4.,
25. **Behjatnia, S. A. A., A. R. Afsharifar. V. Tahan., M. H. Amid Motlagh., O. Eini Gandomani. A. Niazi., K. Izadpanah. 2011.** Widespread occurrence and molecular characterization of wheat dwarf virus in Iran. Australasian Plant Pathol.40:12-19.
26. **Bendahmane, M., H. J. Schalk, and B. Gronenborn. 1995**. Identification and characterization of wheat dwarf virus from France using a rapid method for geminivirus DNA preparation. *Phytopathology* 85, 1449–55.
27. **Benkovicsab, A. H., G. Vidac, D. Nelsond, O. Veiszc, I. Bedfordd, D. Silhavya, H. Bulton. 2010.** Partial resistance to Wheat dwarf virus in winter wheat cultivars *Plant Pathology* 59, 1144-1151
28. **Bhat, M. G., A. B. Joshi, and M. Singh. 1982.** Hairiness in relation to resistance to jassids (Amrasca devastans) and other insect pests and quality characters in cotton (Gossypium spp.), a review. *Agriculture. Reviwe*. 3 : 108.
29. **Bisztray, G. and R. Gáborjányi. 1989.** Isolation and characterization of wheat dwarf virus found for the first time in Hungary. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 96, 449-54.
30. **Black, L.M., and Oman, P.W., 1947.** Parthenogenesis in a leafhopper, Agallia quadripunctata (Provancher) (Homoptera: Cicadellidae). Entomol Soc Wash 49:19–20
31. **Blocker, H.D., D.Q. Fang, and W.C. Black. 1995.** Review of Nearctic Deltocephalus-like leafhopper. (Homoptera; cicadellidae). Aunals of the *Entomologyical society of America* 88: 294-315.
32. **Bosque-Perez, N.A. 2000.** Eight decades of Maize streak virus research. *Virus Research* 71, 107±121.

33. **Briddon, R. W., M. S. Pinner, J. Stanley, and P. G. Markham. 1990.** Geminivirus coat protein replacement alters insect specifcity. *Virology* 177, 85±94.
34. **Bukvayová, N., M. Henselová, V. Vajcáková, and T. Kormanová. 2006.** Occurrence of dwarfvirus of winter wheat and barley in several regions of Slovakia during the growing seasons 2001-2004. Plant, soil and environment 52, 392-401.
35. **Chiykowski, L.N., and R.C. Sinha. 1970.** Sex and age of Macrosteles fascifrons in relation to the transmission of the clover proliferation causal agent. Ann. Entomol. Soc. Am. 63: 1614Ð1617.
36. **Choudhury, M.M., and E. Rosenkranz. 1983.** vector relationship of cvaminella nigrifrons to maize chlorotic dwarf virus. Phytopathology. 73: 685-690.
37. **Chowdhury, A.K. and S. Biswas. 1997.** Feeding behaviour of Nephotettiy inpicticeps (Distant) avector of tungro virus on rice varieties with different level of resistance. Entomology, 22(2): 151-155. (Cicadellidae). Smithsonian Contrib. Zool. No. 74. 40 p.
38. **Delong, D. 1948.** The leafhoppers, or Cicadellidae, of Illinois (Eurymelinae, alcluthinae). Bulletin of the Illinois Natural History Survey 24(2): 376 pp.
39. **Dietrich, C.H. 2005.** Keys to the families and Cicadomorpha and subfamilies and tribes of cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Florida *Entomol*., 88 (4): 502-517.
40. **Dlabola, J. 1957.** Species generis Psammotettix Hpt. Bohemiae et Moraviae, Gasopsis ceskoslovenskċ Spolecnosti *Entomologickė*, 62: 54-58.
41. **Dmitriev D.A. 2002.** General morphology of leafhopper nymphs of the subfamily Deltocephalinae (Hemiptera: Cicadellidae). Acta *Entomologica* Slovenica 10(1): 65–82.
42. **Dmitriev, D.A. 2009**. A new interpretation of homologies of the head of Auchenorrhyncha (Hemiptera) based on nymphal morphology. Abstr. 5th Europ. Hemiptera Congr. 31 Aug. – 4 Sept. 2009, Velence, Hungary. – Hungary: Plant Protection Inst. Hungarian. Acadime. Sci. – P. 14–15
43. **Fauquet, C.M. 2003**. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of virology* 148, 405-21.
44. **Felix, I., J.M. Larcher, J. Maraby, G. Philippeau, and K. Vinatier. 1992.** Risques d'attaques de cicadelles et conditions d'efficacit!e des insecticides. Perspect. Agric. 173, 98–106.
45. **Fohrer, F., Lebrun, I., Lapierre, H., 1992.** Acquisition recente sur le virus du nanisme du ble. Phytoma 443, 18-20.

46. **Francki, R.I.B., Hatta, T., Grylls, N.E., Grivell, C.J. 1979.** The particle morphology and some other properties of chloris striate mosaic virus. Ann Appl Biol 91:51–59.
47. **Fukushi, T. 1940**. Further studies on the dwarf disease of rice plant. *Journal of the Faculty of Agriculture*, Hokkaido Imperial University 45, 83-154.
48. **Genung, W.G., And F. W. Mead. 1969.** Leafhopper populations (Homoptera: cicadellidae) on five pasture grasses in the Florida Everglades. Florida Entomology. 52: 165-170.
49. **Giustina, W.D., I. Lebrun, H. Lapierre, S. Lochon. 1991.** Distribution g!eographique du vecteur et du virus. *Phytoma* 432, 30–34.
50. **Greene, James F. 1971.** A revision of the Nearctic species of the genus Psammotettix (Homop- tera: Cicadellidae). Smithsonian Contrib. Zoology. No. 74. p:44
51. **Gugielmino, A., and E. G. Virla. 1997**. Postembryonic development and biology of Psammotettix alienus (Dahlbom) (Homoptera, Cicadellidae) under laboratory conditions. Boll. Zoology. *Agriculture. Bachic*. 29, 65–80.
52. **Hull, R. 2002**. Matthews' plant virology. 4th edition. Academic press, San Diego, CA. ISBN: 978-0123611604. 445 -470
53. **Hunt, R. E., L. R. Nault, and R. E. Gingery. 1988.** Evidence for infectivity of Maize chlorotic dwarf virus and for a helper component in its leafhopper transmission.
54. **Hunter, W.B., and E.A. Backus. 1989.** Comparison of feeding behavior of the potato leafhopper *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) on alfalfa and broad bean leaves. *Environmental Entomology* 18: 473-480.
55. **Husain, M. A., and K. B. Lal. 1940.** The bionomics of Empoasca devastans on some varieties of cotton in punjob. Indian *jornal. Entomology*. Z: 120-136.
56. **Huth, W. 2000.** Viruses of Graminae in Germany – a short overview. *Journal of plant disease and protection* 107, 406-14.
57. **İlbağı, H., A. Çıtır and Ü.Yorgancı. 2005**. Occurence of virus infections on cereal crops and their identifications in the Trakya region of Turkey. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz.112 (4): 313-320 In: Granoff A,Wagner RG (eds) Encyclopedia of virology, Vol. 3. Academic Press,
58. **Irwin, M. E., and W. G. Ruesink. 1986**. Vector intensity: a product of propensity and activity, pp. 13-33. In: Mclean, G.D., Garrett, R. G., Ruesink, W. G. (eds): Plant virus Epidemics: Monitoring, Modelling and Predicting Outbreaks. Acad. Press, New York.
59. **Jackson A. O., M. Goodin, I. Moreno, J. Johnson, D. M. Lawrence 1999**. Biology, structure and replication of plant rhabdoviruses. In *the Rhabdoviruses*, ed. R. R. Wagner, pp. 427-507. New York; Plenum.

60. **Janjua, N. A. and G. Chaudry. 1964.** Biology and control of hill fruit insects of West Pakistan. Pakistan Gov. Press, Karachi. 158 pp.
61. **Jezewosk, J. 2001.** First report of Wheat dwarf virus occurring in Poland. *Phytopatholoia* Polonica 21, 93-100.
62. **Jilaveanu, A. and J. Vacke. 1995.** Isolation and identification of wheat dwarf virus (WDV) in Romania. Probleme de protectia plantelor 23, 51-62.
63. **Johson, C. G., and L. R. Taylor. 1965**. The development of large suction traps for airborne insects. Ann. Appl. *Boilogy*. 43, 51-62.
64. **Jonse, V.P., P. Anderson, P.A. Wong, P. Follett, J.S. Yang, D. Westcot, and D.E. Ullman. 2000**. Feeding damage of the introduced leafhopper, Sophonia rufofascia (Homoptera: Cicadellidae), to plants in forests and watersheds of the Hawaiian Islands. Environ. *Entomology.* 29:171-180
65. **Kalkandelen, A.,** 1974. A study on taksonomy of specirs of the family Cicadellidae in central Anatolia. Zirai Mücadele ve Koruma Genel Müdürlügü, Aratirma Eserleri Serisi, 221 pp.
66. **Kapooria, R.G. and J. Ndunguru. 2004.** Occurrence of viruses in irrigated wheat in Zambia. EPPO/OEPP bulletin 34, 413-9.
67. **Kersting, U., H. Baspinar, N. Uygun, S. Satar.** 1997. Flight patterns of some leafhopper species (Homoptera: Cicadellidae) in a young citrus orchard. In: Proc. 3rd Turkish Nat. Conger. Ent. 14-21.
68. **Kirkaldy, G.W. 1906.** Leafhoppers and their natural enemies. Bull. Hawaii, sug. pl. Ass. Exp. sta. 1(9) : 271-479.
69. **Köklü G, J.N.E. Ramsell, A. kvarnheden. 2007**.The complete genome sequence for a Turkish isolate of wheat dwarf virus (WDV)from barly confirm the presence of two distinct WDV strains.*Virus Gene* 34, 359-66
70. **Köklü G. 2004.** Occurrence of cereal viruses on wheat in Tekirdag, Turkey. *Phytoprotection*, 85,19-25
71. **Kumari, S.G., I. Muharram, K.M. Makkouk, A. Al-Anis, R. El-Pasha, W. A. Al-Motwkel, A. Haj Kassem. 2006**. Identification of viral disease affecting barley and bread wheat crops in Yemen. *Australasian Plant Pathology*, 35: 563-568.
72. **Kundu, J. K. 2009**. Discrimination and genetic diversity of wheat dwarf virus in the Czech Republic. *Virus Genes* 38: 468-474.
73. **Kvarnheden, A., M. Lindblad, , K. Lindsten, and J.P.T. Valkonen. 2002**. Genetic diversity of Wheat dwarf virus. *Archives of virology* 145, 205-16.
74. **Lapierre, H. D., and D. Hariri. 2008.** Cereal viruses: wheat and barley. *Encyclopedia of virology* (Third Edition). 490-497

75. **Lapierre, H., M.T. Cousin, W.D. Giustina, J.P. Moreau, Khogali, M. Roux, B. Gelie, and E. Ollier. 1991**.. Agent pathogene et vecteur. Description, biologie, interactions. *Phytoma* 432:26-28.
76. **Lee, Y. I. 1983** The potato leaf hopper, Empoasca fabae, Soybean. Puhescence and hopperburn resistance. Ph. D. Diss. Univ. of Illinois. Urbana (Diss Abstr. Int. 36B: 2057)
77. **Lemmetty, A., and E. Huusela-Veistola. 2005.** First report of Wheat dwarf virus in winter wheat in Finland. *Plant disease* 89, 912.
78. **Lindblad , M., and P. Arenö. 2002.** Temporal and spatial population dynamics of Psammotettix alienus, a vector of wheat dwarf virus. Int. J. *Pest. Managment*. 48, 233-238.
79. **Lindblad, M., and R. Sigvald. 2004**. Temporal spread of wheat dwarf virus and mature plant resistance in winter wheat. *Crop Protection* 23, 229–34.
80. **Lindblad, M., M. Sandgren, and R. Sigvald. 1999.** Epidemiology and control of wheat dwarf. In: Proceeding of VIIth International Plant Virus Epidemiology Symposium. Aguadulce (Almeria), Spain, 11-16 April 1999. P. 114 (abstract).
81. **Lindblad, M., Waern, P., 2002.** Correlation of wheat dwarf incidence to winter wheat cultivation practices. *Agriculture, Ecosys. Environ*. 92.
82. **Lindsten, K. 1959.** A preliminary report of virus diseases of cereals in Sweden . Journal of *Phytopathology*, 35: 420–428.
83. **Lindsten, K. 1970.** A preliminary report on three cereal virus diseases new to Sweden spread by Macrosteles- and Psammotettix leafhoppers. National Swedish institute for plant protection contributions 14, 285-97.
84. **Lindsten, K., and B. Lindsten. 1999.** Wheat dwarf an old disease with new outbreaks in Sweden. Journal of *plant disease and protection* 106, 325-32.
85. **Lindsten, K., and J. Vacke. 1991.** A possible barley adapted strain of wheat dwarf virus (WDV). *Acta phytopathologica et entomologica Hungarica* 26, 175-80.
86. **Lindsten, K., B. Lindsten, M. Abdelmoeti and N. Juntti. 1980.** Purification and some properties of wheat dwarf virus. Proceedings of the 3rd conference on virus diseases of Gramineae in Europe, Rothamsted, May 27-30, pp 27-31.
87. **Linnavuori, R**., **1972.** Revisional studies on African Leafhoppers (Homoptera Cicadelloidea). Rev. *Zool. Bot. Afr*. – Vol. 86, N 3–4. – P. 196–252.
88. **Lodos, N. and A. Kalkandelen**, **1987.** Preliminary list of Auchenorrhyncha with notes on distribution and importance of species in Turkey. XXVI Family Cicadellidae: Deltocephalinae: Paralimnini (part II). *Türk. Entomology. Derg*., 11(4): 195-202.

89. **Mackenzie, D.J., M.A. McLean, S. Murkerji and M. Green. 1997.** Improved DNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogen by polymerase chain reaction . *Plant Disease*. 81:222-226

90. **Makkouk, K. M, S. G. Kumari, W. Ghulam and N. Attar. 2004.** First record of Barley yellow striate mosaic virus affecting wheat summer-nurseries in Syria *Plant Disease* 88 (1), 83-83

91. **Makkouk, K. M. 1987**. Testing for barley yellow dwarf virus (BYDV) at ICARDA. RACHIS 6:43

92. **Makkouk, K. M. and J. Skaf. 1989.** A typical BYDV variant affecting cereal in Syria. Barley Yellow Dwarf Newsletter, CIMMYT, Mexico, 2: 17.

93. **Makkouk, K. M. and S. G. Kumari**. **1993.** Production of antisera for sensitive detection of two cereal viruses by different ELISA variants. RACHIS 12(1/2):24-27.

94. **Makkouk, K. M., O. I. Azzam, , J. Skaf, M. El-Yamani, C. Cherif, and A. Zouba. 1990.** Situation review of barley yellow dwarf virus in West Asia and North Africa. pp 61-65 In World Perspectives on Barley Yellow Dwarf. Burnett P.A. (ed.). CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico..

95. **Makkouk, K. M., W. Ghulam and S. G. Kumari. 2001.** First record of barley yellow striate mosaic virus infecting barley and wheat in Lebanon. *Plant Disease,* 85:446.

96. **Makkouk, K.M. and S.G. Kumari. 1997**. Natural occurrence of wheat streak mosaic virus on wheat in Syria. Rachis Newsletter 16(1/2): 74-76.

97. **Mamluk, O. F., and J. Van Leur. 1984**. Situation report ICARAD region. Pages 194-195. In: Barley yellow dwarf – A Proceeding of the Workshop. December 6-11, 1983 CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico. P. A. Burnett (ed.). 209 pp.

98. **Mamluk, O.F., L. Cetin, H. J. Braun, N. Bolat, L. Bertschinger, K. M. Makkouk, A. F. Yildirim, E. E. Saari, N. Zencirci, S. Albustan, S. Cali, S.P.S. Beniwal, and F. Dusunceli. 1997.** Current status of wheat and barley diseases in the Central Anatolian Plateau of Turkey. Phytopath Medit **36**:167-181

99. **Manurung. B., W. Witsack, S. Mehner, M. Gruntzig, and E. Fuchs. 2004.** The epidemiology of Wheat dwarf virus in relation to occurrence of the leafhopper Psammotettix alienus in Middle-Germany. *Virus research* 100, 109-13.

100. **Martin, D. P., J. A. Willment, R. Billharz, R. Velders, B. Odhiambo, J. Njuguna, D. James, and E .P. Rybicki. 2001.** Sequence diversity and virulence in Zea maize of Maize streak virus isolates. *Virology* 288, 247-55.

101. **Matcalf, Z. P. 1967**. General Catalogue of the Homoptera. Fascicle VII. Cercopoidea. Parts 1-4. Wales University Press, Baltimore.
102. **Mcyedirk, D. E., and G. Oldfield. 1985**. Evaluation of trap color and height placement for monitoring Circulifer tenellus (Baker) (Homoptera: Cicadellidae). Canadian. Entomology. 117, 505-511
103. **Mehner S., 2005.** Zur Ökologie des Wheat dwarf virus (WDV) in Sachsen-Anhalt. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Germany. : 212-217
104. **Mehner, S., B. Manurung, M. Gruntzig, , A. Habekuss, W. Witsack and E. Fuchs 2003.** Investigations into the ecology of the Wheat dwarf virus (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. Journal of *plant diseases and protection* 110, 313-23.
105. **Michael, R. W. 2007.** A handbook of leafhopper and planthopper vectors of plant disease Bulletin of Insectology 60 (2): 175-176, 2007 ISSN 1721-8861
106. **Milne, R.G. and M. Conti. 1986**. Barley yellow striate mosaic virus. AAB Description of plant viruses No. 312. Commonwealth Mycology Institute and Association of Applied Biologistes, Wellebourne, UK. 5pp.
107. **Müller, H.J. 1974**. Farb-Polymorphismus bei Larven der Jasside Mocydia crocea H.-S. (Homoptera Auchenorrhyncha). Zoology. Anz. Jena. – Bd. 192, H. 5–6. – S. 303–315
108. **Najar, A., K.M. Makkouk, H. Boudhir, S.G. Kumari, R. Zarouk, R. Bessai, and F.B. Othman. 2000.** Viral diseases of cultivated legume and cereal crops in Tunisia. Phytopathologia mediterranea 39, 423-32.
109. **Nault, L. and E.D. Ammar, 1989.** Leafhoppers and planthoppers transmission of plant viruses. Ann. Rev. *Entomol*. 34: 503-529.
110. **Nault, L. R. 1997.** Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. Ann. *Entomol*. Soc. Am. 90: 521Ð541.
111. **Nielsion, M. W., 1979.** Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens, pp. 3-27. In: Leafhopper Vectors as Plant Disease Agents (MARAMOROSCH K., HARRIS K., Eds).- Academic Press, New York, USA.
112. **Nielsion, M.W. 1985.** Leafhopper systematic. In: "The leafhoppers and Planthoppers", Nault, L. R. and J.G. Rodriguez, (Editors), Wiley & Sons, New York : 11- 39.
113. **Nienhaus, F. and A.T. saad. 1967.** First report an plant virus disease in Lebanon, Jordan and Syria. Zeitschrift für pflanzen krankheiten und pflanzenschutz, 74: 459-471.
114. **Nilsson-Ehle, H. 1918.** Arets svåra vetesgukdom. Landtmannen, 1, 564-566. Ossiannilsson, F. 1983. Fauna Entomological Scandinavica 7:3. 813-815, plate-fig. 196

115. **Novone P. 1987:** Origine, sturtture funzioni di escreti entomatici di aspetto ceroso distribuiti sul corpo mediante zampe. Ann, Fac. Sci. Agr. Univ, Torino 14: 237-294**.** New York, pp 1531–1541 New York, pp 1531–1541.

116. **Nuss, D. L. 1984.** Molecular biology of wound tumor virus. Adv. Virus Research. 29:57-93. of Eupteryx (Curt.) *Acta Entomol*. Fenn. 38: 43.

117. **Oluwafemi, S., 2006.** Genetic variation among active and inactive transmitters of Maize streak virus within a population of Cicadulina storeyi China (Homoptera: Cicadellidae). *Afr. J. Biotech.,* 5: 590-596.

118. **Osborn. H. 1932.** Leaf hoppers injurious to cereal and forage crops. Circular of the United States Department of Agriculture 241: 1–34.

119. **Ossiannilsson, F. 1983.** The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 3. In: Fauna Entomologica Scandinavica, Vol. 7, Scandinavian Science Press Ltd., Klanpenborg, 1983, p. 594-979. ISBN 87-87491-13-3.

120. **Power, A.G**., **1987**. Plant community diversity, herbivore movement, and an insect-transmitted disease of maize. *Ecology* 68, 1658-1669.

121. **Power, A.G., 1992**. Host plant dispersion, leafhopper movement and disease transmission. Ecol. Ent. 17, 63-68.

122. **Praslicka, J. 1996.** Vplyv niektorych faktorov na napadnutie psenice ozimnej virusovou zakrpatenostou psenice (WDV). Ochr. Rostlin UZPI 32, 181–186. Psammotettix alienus, a vector of wheat dwarf virus. International *journal of pest quadripunctata* (Provancher) (Homoptera: Cicadellidae). *Entomol* Soc Wash 49:19–20.

123. **Raatikainen, M., and Vasarainen, A. 1975.** Composition, zonation and origin of the leafhopper of oatfields in Finland. In: Annls Zool. Fenn., Vol. 13, 1976, p. 1-24.

124. **Ramsell, J. 2007.** Genetic variability of Wheat dwarf virus. Doctoral diss. Dept. of Plant Biology and Forest Genetics, SLU. 41.

125. **Ribaut, H. 1925**. Le genre Psammotettix Hpt. Bulletin de la sociėtė d□Histoire Naturelle de Toulouse, 73: 166-170.

126. **Rubies, A. C., M. Turina, and V. Vallega. 1995.** Virus diseases of wheat in Italy. Informatore fitopatologico 45, 24-35.

127. **Schiemenz, H. 1969**. Entomologische Abhandlungen .staatliches Museum fur Tierkunde in Dresden. Die Zikadenfauna mitteleuropäischer Trockenrasen, Bd 36, Nr.6.

128. **Schubert, J., A. Habekuß, K. Kazmaier and H. Jeske. 2007.** Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany − Diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. Virus research 127, 61-70.

129. **Sinha, R.C. 1967.** Response of wound tumor virus infection in insects to vector age and temperature. Virology 31:746-748.

130. **Slykhius, J. T. 1963.** Vector and host relations of North American wheat striate mosaic virus. Canadian. Jornal. Bot. 41, 1171-85.
131. **Southwood, T. R. E**., 1978. Ecological methods. Chapman and Hall, London. pp.391.
132. **Stewart, A.J.A. 1981.** Nynphal polymorphism in two species of Eupteryx (Curt.) Acta Entomol. Fenn. 38: 43.
133. **Theron, J.G., 1982.** Leafhopper (Hemiptera; cicadellidae) on grapevines in south Africa, J. ent. Soc. Sth. AFr. U5, 23-26.
134. **Time, R. 2000**. Biological control of variegated grape leafhopper.book. 430 pp
135. **Tullgren, A.1918.** Några ord om förödelsen på vetefälten infom Götaland och den sannolika orsaken Därtill. Landtmannen 1, 504 – 507.
136. **Uygun, N., and H**. **Baspinar. 1987.** The importance of trap colors and height I sampling of Cicadellidae (Homoptera), p. 407-415. In : proc 1st Turkish Nat. Congr. Of Entomology. Ent. Derngi Yayinlari: 3 (Turkish).
137. **Vacke J., Kvarnheden A., Lindblad M., Lindsten K. 2004**: Wheat dwarf. In Lapierre H., Signoret P. A. eds. Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Gramineae). INRA, Paris, France. pp: 478, 590-593.
138. **Vacke, J. 1961.** Wheat dwarf virus disease. Biologia Plantarum, Praha 3, 228-33.
139. **Vacke, J. 1972.** Host plants range and symptoms of wheat dwarf virus. Vzkumnch êstav Rostlinné Vroby Praha-Ruzyn 17, 151-62.
140. **Vacke, J., Cibulka, R., 1999.** Silky bent grass (Apera spica-venti [L.] Beauv.) a new host and reservoir of wheat dwarf virus. Chundelka Metlice 35, 47–50.
141. **Wecbmar, M. B., and E. P. Rybicki. 1985**. Brome mosaic virus infection mimics barley yellow dwarf virus disease symptoms in small grains. Phytoputhol. Z. 114, 332-7.
142. **Wilson, L. T., D.L. Flaherty, W.H. Settle, H. Andris, C. Pickett, and D. Gonzalez. 1987**. Managing the variegated and grape leafhoppers. Pages 5-11.
143. **Xie, J., Wang, X., Y. Liu, Y. Peng, and G. Zhou. 2007.** First report of the occurrence of Wheat dwarf virus in wheat in China. *Plant disease* 91, 111.
144. **Zachvatkin, A. A.** 1933. Sur queleues Homopteres interessants de la faune Italienne. Memorie della Societ, Entomologica Italiana, 12: 262-272.